

Aus der Abteilung für Gynäkologische Endokrinologie
(Leiter: Prof. Dr. J. Hammerstein)
der Frauenklinik und Poliklinik der Freien Universität Berlin
(Direktor: Prof. Dr. G. Hörmann)

BESTIMMUNG
DER ÖSTROGEN-POTENZ KONTRAZEPTIVER STEROIDE
MIT HILFE DER TRASCORTIN-BINDUNGSKAPAZITÄT
IM MENSCHLICHEN PLASMA
— Methodische und klinische Untersuchungen —

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den
Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

1973

vorgelegt von
Ulf Schwartz
aus Posen

Aus der Abteilung für Gynäkologische Endokrinologie
(Leiter: Prof.Dr.J.Hammerstein)
der Frauenklinik und Poliklinik der Freien Universität Berlin
(Direktor: Prof.Dr.G.Hörmann)

BESTIMMUNG
DER ÖSTROGEN-POTENZ KONTRAZEPTIVER STEROIDE
MIT HILFE DER TRANSCORTIN-BINDUNGSKAPAZITÄT
IM MENSCHLICHEN PLASMA
- Methodische und klinische Untersuchungen -

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ulf Schwartz
aus Posen

Referent: Professor Dr.med. Jürgen Hammerstein

Korreferent: Privat-Dozent Dr.med.vet. Friedmund Neumann



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am 22.Mai 1973

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN

1. EINLEITUNG	1
1.1. Östrogen-Potenz hormonaler Kontrazeptiva: Notwendigkeit und Problematik ihrer Bestimmung	1
1.2. Aufgabenstellung	3
2. transcortin: physiko-chemische & biologische eigenschaften	4
2.1. Corticoid-Transport im Blut	4
2.2. transcortin-Bindungsaffinität	6
2.3. transcortin-Bindungskapazität	7
3. methodisch-experimenteller teil	9
3.1. Vorbemerkungen	9
3.1.1. transcortin-Bindungskapazität: Bestimmungsverfahren	9
3.1.2. Isotopen-Gelfiltration: Theoretische Grundlagen	10
3.2. Methodische Aufgabenstellung	11
3.3. Chemikalien und Geräte	11
3.4. Endgültige Arbeitsvorschrift	13
3.5. Methodisch-experimentelle Ergebnisse	17
3.5.1. Gewinnung, Aufarbeitung und Aufbewahrung der Proben	17
3.5.2. Entfernung der Steroide ("stripping")	18
3.5.3. Sättigung der transcortin-Bindungsstellen	21
3.5.4. Isolierung der transcortin-gebundenen Cortisolfraktion	23
3.5.5. Radioaktivitäts-Bestimmung	29
3.5.6. transcortin-Bindungskapazität unter physiologischen, pathologischen und kontrazeptiven Bedingungen	30
3.5.7. Empfindlichkeit	31
3.5.8. Präzision	32
3.6. Diskussion	34
3.6.1. Zuverlässigkeit	34
3.6.2. Praktikabilität	42
4. klinisch-experimenteller teil	44
4.1. Vorbemerkungen	44
4.1.1. Östrogen-Potenz: Definition	44
4.1.2. Östrogen-Potenz: Bestimmungsverfahren	44
4.2. Klinische Fragestellung	47

4.3. Probandinnen und Therapieschema	48
4.4. Klinisch-experimentelle Ergebnisse	52
4.4.1. Wirkung kontrazeptiver Östrogene	52
4.4.2. Wirkung kontrazeptiver Gestagene	56
4.4.3. Wirkung hormonaler Kontrazeptiva (Einphasenpräparate)	57
4.4.4. Wirkung eines lokal applizierten Östrogens	59
4.5. Diskussion	60
4.5.1. Zuverlässigkeit der Bestimmungsmethode	60
4.5.2. Biologisches Wirkungsspektrum kontrazeptiver Steroide	63
4.5.3. Östrogenversorgung der Frau unter kontrazeptiven Bedingung	70

5. ZUSAMMENFASSUNG

74

LITERATURVERZEICHNIS

77

LEBENSLAUF

ABKÜRZUNGEN

c	=	Konzentration
°C	=	Grad Celsius
CA	=	kompetitive Adsorption
CBC	=	Cortisol-Bindungskapazität
CBG	=	"corticosteroid-binding globulin"; TC
cpm	=	Impulse pro Minute
dpm	=	Zerfälle pro Minute
EA	=	enzymatischer Assay
ED	=	Äquilibriumdialyse
EE	=	Äthinylostradiol
EEME	=	Mestranol
F	=	Cortisol; Hydrocortison
g	=	Gramm
G	=	schwängere Patientinnen
GF	=	Gelfiltration
HSA	=	Human-Serumalbumin
HSA-B	=	Albumin-gebunden
k	=	Assoziationskonstante
K	=	Volumenkorrekturfaktor
L	=	Liter
µCi	=	Mikrocurie
µg	=	Mikrogramm
mg	=	Milligramm
min	=	Minute
ml	=	Milliliter
mol	=	Mol
n	=	Anzahl
N	=	normale Probanden
nm	=	Nanometer
OC	=	orale Kontrazeptiva
p	=	Irrtumswahrscheinlichkeit
PB	=	eiweiß-gebunden
PE	=	Papierelektrophorese
r	=	Korrelationskoeffizient
rpm	=	Umdrehungen pro Minute
RT	=	Raumtemperatur
s	=	Standardabweichung
SA	=	spezifische Aktivität
T	=	Ultraviolett-Durchlässigkeit
TC	=	Transcortin; CBG
TC-B	=	Transcortin-gebunden
TC-BA	=	Transcortin-Bindungsaffinität
TC-BC	=	Transcortin-Bindungskapazität
UB	=	ungebunden
UF	=	Ultrafiltration
V	=	Variationskoeffizient
WF	=	Wiederfindung
$\bar{x}$	=	Mittelwert

Digitized by the Internet Archive
in 2026

1. EINLEITUNG

- 1.1. Die Verabfolgung kontrazeptiver Steroide bedeutet einen tiefen Eingriff in die endokrinen Regulationsvorgänge gesunder Frauen. Sie ist verbunden mit einem gewissen Gesundheitsrisiko, das allerdings unter dem Aspekt einer zuverlässigen Empfängnisverhütung in Kauf genommen wird (139). Der weltweite, millionenfache Konsum dieser Pharmaka verdeutlicht die Notwendigkeit, hormonale Kontrazeptiva einer ständigen, kritischen Überprüfung hinsichtlich ihrer qualitativen und quantitativen Zusammensetzung zu unterziehen (135).

Im Vordergrund der praxisnahen Diskussion über die Nebenwirkungen von Einphasenpräparaten und deren Ursachen steht zur Zeit die Frage nach der optimalen Östrogendosierung. Eine Reihe von Autoren vertritt die These, daß die Einnahme von Kontrazeptiva mit niedrigem Östrogengehalt zu einer relativen Östrogenverarmung des weiblichen Organismus führt (54,90,163,170,171,301). Auf der anderen Seite wird eine weitere Reduzierung der täglichen Östrogendosis empfohlen, um die möglicherweise durch eine Östrogenübersversorgung induzierte Gefahr der Förderung thromboembolischer Prozesse einzuschränken (5,36,161,306,307).

Für die Grundlagenforschung ergibt sich die Aufgabe, das Wirkungsspektrum kontrazeptiver Steroide eingehender als bisher in Untersuchungen am Menschen zu analysieren. Dabei hat die Beurteilung der Östrogen-Potenz hormonaler Kontrazeptiva von der Feststellung auszugehen, daß angesichts der unterschiedlichen Wirksamkeit pro Gewichtseinheit nicht die applizierte Östrogenmenge, sondern allein die zugeführte biologische Aktivität ausschlaggebend ist (18,78,112,138,141,299). Folglich müssen bei der Bestimmung der Gesamt-Östrogenizität von Kombinationspräparaten neben den Eigenschaften des Östrogenanteils auch östrogene bzw. anti-östrogene

Partialwirkungen der Gestagenkomponente als Kriterium berücksichtigt werden (15,70,84,85,116,164,171,183,287). Ferner kommt dem Grad der Unterdrückung der Östrogensekretion eine Bedeutung zu (106).

Die Problematik in der Ermittlung der Östrogenwirksamkeit ist bedingt durch die Vielzahl der verwendeten kontrazeptiven Steroide bei einer nur geringen Anzahl exakter Bestimmungsmethoden im Humanversuch. Es gibt in der Literatur wenige systematische Untersuchungen zur Frage der Östrogen-Aktivität; die Erforschung der theoretischen Grundlagen hat mit der rapiden Entwicklung auf dem Gebiet der hormonalen Empfängnisverhütung bisher nicht Schritt halten können (137).

Zur quantitativen Erfassung des Östrogenmilieus im weiblichen Organismus unter kontrazeptiven Bedingungen eignen sich allein solche Parameter, die einerseits auf alle Östrogene - endogene wie synthetische - gleichermaßen reagieren, andererseits aber durch Gestagene nicht im Sinne eines Östrogenantagonismus qualitativ beeinflusst werden. Die Reaktion der genitalen Erfolgsorgane auf eine gleichzeitige Applikation von Östrogenen und Gestagenen entspricht letztlich einem quantitativ nicht zu differenzierenden Summationseffekt (2,9,38,54,114,181,192,193,219,298,300). Die Auswertung von Untersuchungen an Endometrium und Vaginalepithel gestattet daher nur eine qualitative Aussage bezüglich der relativen Östrogen- oder Gestagendominanz bzw. Ausgewogenheit von Einphasenpräparaten.

Dagegen stellt die Transcortin-Bindungskapazität für Cortisol eines der wenigen östrogen-spezifischen, progesteron-unabhängigen Indikatorsysteme dar, das infolge seiner Dosisabhängigkeit einen quantitativen Vergleich der Östrogen-Potenz von Sexualhormonen erlaubt (6,75,157,174,175,215,253,261,272,274,277). Allerdings ist die Transcortin-Analyse auf Grund der niedrigen Plasmakonzentration dieses Trägerproteins mit methodischen Schwierigkeiten verbunden.

Zuverlässigkeit und Praktikabilität der bisher angegebenen Verfahren lassen teilweise noch zu wünschen übrig. So besteht die Möglichkeit einer artifiziellen Verfälschung der Meßwerte im Zusammenhang mit einer in-vitro-Beeinflussung der Transcortin-Bindungskapazität für Cortisol durch konkurrierende Steroide und Albumin (64,67,73,248,253,255,256,271,313,314). Außerdem erfordern die meisten Techniken eine zusätzliche Bestimmung des endogenen Cortisol-Spiegels (58,73).

1.2. Es ergibt sich folgende experimentelle Aufgabenstellung:

- a) die Ausarbeitung eines vereinfachten und zuverlässigeren Verfahrens zur Messung der Transcortin-Bindungskapazität im menschlichen Plasma und
- b) die in-vivo-Bestimmung der Östrogen-Potenz hormonaler Kontrazeptiva (Einphasenpräparate) einschließlich ihrer Östrogen- bzw. Gestagenkomponenten mit Hilfe dieser Methode.

Die Ergebnisse sollen als Beitrag zu Fragen des biologischen Wirkungsspektrums kontrazeptiver Steroide und der Östrogenversorgung des weiblichen Organismus bei der hormonalen Empfängnisverhütung dienen.

2. TRANSCORTIN : PHYSIKO-CHEMISCHE & BIOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN

Anmerkung: Übersichtsartikel, in denen die bisher vorliegenden Erkenntnisse der Transcortin-Forschung umfassend referiert werden, sind von TAIT & BURSTEIN (297) SANDBERG und Mitarbeitern (253), SEAL & DOE (271,274) sowie WESTPHAL (313,314) veröffentlicht worden.

- 2.1. Der Corticoid-Transport im Blut wird charakterisiert durch den Zustand eines Fließgleichgewichtes: unter physiologischen Bedingungen zirkuliert nur ein kleiner Anteil der unkonjugierten Nebennierenrindenhormone in ungebundener Form, während der Großteil reversibel an die Serumeiweiße Transcortin und Albumin gekoppelt ist (31,32,34,40,41,45,49,52,58,179,204,229,240,248,253,254,257,260,280,297,305,316; s.Tab.1).

Tab.1: Cortisol-Transport im Blut in Abhängigkeit von der Plasma-Cortisolkonzentration (nach TAIT & BURSTEIN 1964)

Gesamt F-c	TC-B F	HSA-B F	UB F
10 µg%	89,6 %	5,9 %	4,5 %
100 µg%	24,0 %	43,0 %	33,0 %

Abk.: F-c = Cortisolkonzentration; TC-B = Transcortin-gebunden; HSA-B = Albumin-gebunden; UB = ungebunden.

Beim Transcortin (Synonym: CBG = "corticosteroid-binding globulin") handelt es sich um ein spezifisch Steroide bindendes α -1-Glucoprotein mit einer hohen Affinität zu Cortisol; sein Molekulargewicht beträgt ca. 52000, die Anzahl der Bindungsstellen pro Molekül wird mit n=1 angegeben (46,77,210,253,267,268,269,270,271,282). Überschreitet die Cortisolkonzentration (Plasma-Normalwert: 12-14 µg%; nach SANDBERG et al. 1967) die relativ geringe Transcortin-Bindungskapazität (Normalwert: 17-25 µg%; ibid.), so wird das überschüssige Hormon unspezifisch an Albumin gekoppelt, das durch eine schwache Bindungsaffinität, dafür aber größere Kapazität gekennzeichnet ist (40,43,45,52,253,271,297,313,314; s.Tab.1).

Die Bildung des Transcortin-Cortisol-Komplexes ist reversibel (42,253,313) und bedingt

- a) eine biologische Inaktivierung des Steroidhormons (11,65,77,158,160,209,216,231,253,258,259,271,279,297,314),
- b) eine Hemmung der Verstoffwechslung des Transcortin-gebundenen Cortisols in der Leber (16,35,56,58,65,174,175,201,206,209,216,242,253,256,258,259,297,317),
- c) eine Zunahme der relativ geringen Steroidlöslichkeit (65,77,253,260,314).

Dem Trägereiweiß CBG kommt damit neben der früher überbetonten Transportaufgabe (8) eine bedeutsame Schutz- und Reserve-Funktion bei der Regulierung des biologisch wirksamen Hormonspiegels zu, indem es größere Schwankungen der Cortisol-Sekretionsrate aussteuert (62,205,209,253,297,314).

BINDUNGSPARAMETER : DEFINITIONEN

Transcortin-Bindungsaffinität (TC-BA):

Dieser Parameter gibt die Stärke der Bindung zwischen Steroid und CBG an (142,297,313). Sie wird gekennzeichnet durch die Assoziationskonstante k des Transcortin-Steroid-Komplexes (1/mol).

Transcortin-Bindungskapazität (TC-BC):

Dieser Parameter ist definiert als die Menge an maximal CBG-gebundenem Cortisol bei Besetzung aller vorhandenen Bindungsstellen (58,142,313). Sie wird bestimmt nach der in-vitro-Zugabe von exogenem Cortisol im Überschuß. Die Kapazitätshöhe hängt direkt vom Ausmaß der CBG-Synthese in der Leber ab (60). Sie wird in μg Transcortin-gebundenem Cortisol pro 100 ml Plasma angegeben.

Transcortin-Konzentration (TC-c):

Es handelt sich um einen indirekten Parameter der Gesamtzahl an CBG-Bindungsstellen, die für die Cortisolbindung zur Verfügung stehen (142). Sie läßt sich bei bekannter Anzahl der Bindungsstellen pro CBG-Molekül und bekanntem CBG-Molekulargewicht durch Multiplikation der Transcortin-Bindungskapazität mit dem Faktor 1,44 errechnen (144). Sie wird in mg Transcortin pro 1 L Plasma angegeben.

2.2. Die Transcortin-Bindungsaffinität ist nicht allein auf Cortisol beschränkt (s.Tab.2). So besitzt der Transcortin-Progesteron-Komplex eine dreifach höhere Assoziationskonstante als der Transcortin-Cortisol-Komplex. Allerdings liegt die Progesteronkonzentration mit Ausnahme der Schwangerschaft zu niedrig, um Cortisol an den Bindungsstellen der CBG-Moleküle quantitativ verdrängen zu können (46,57,58,63,64,65,76,248,253,256,271,312,313).

Tab.2: Affinität von Transcortin und Albumin zu verschiedenen Steroiden in Abhängigkeit von der Temperatur (nach SANDBERG et al. 1966 bzw. WESTPHAL 1971)

Steroid	Protein	Temperatur	Assoziationskonst. k
Cortisol	TC	4°C	$5-6 \times 10^8 \text{ mol}^{-1}$
Progesteron	TC	4°C	$3 \times 10^8 \text{ mol}^{-1}$
Progesteron	TC	37°C	$8 \times 10^7 \text{ mol}^{-1}$
Cortisol	TC	37°C	$3 \times 10^7 \text{ mol}^{-1}$
Corticosteron	TC	37°C	$3 \times 10^7 \text{ mol}^{-1}$
Cortisol	HSA	37°C	$0,5-1 \times 10^4 \text{ mol}^{-1}$
Cortisol	HSA	4°C	$5-7 \times 10^5 \text{ mol}^{-1}$

Abk.: TC = Transcortin; HSA = Albumin.

Daher bindet Transcortin laut DE MOOR et al. (58) unter in-vivo-Normalbedingungen in erster Linie Cortisol (79,2%) und Corticosteron (13%); andere Steroide dagegen nur in begrenztem Umfang (11,40,43,45,50,52,57,58,64,76,133,176,253,258,261,271,280). Die Bindungsaffinität ist in starkem Maße temperaturabhängig (in-vitro-Optimum bei 4°C). Temperatursteigerungen führen zu einer reversiblen Aufhebung der Cortisolbindung bei 46°C und zu einer irreversiblen CBG-Inaktivierung bei 60°C (47,48,52,58,66,71,73,124,144,179,204,205,210,223,235,240,253,268,271,280,309,310,312,313,314). Ähnliche Effekte können durch Veränderung des pH-Wertes erzielt werden (52,67,204,213,222,253,268,281,313).

2.5. Die Transcortin-Synthese in der Leber - und damit sekundär Konzentration und Bindungskapazität - ist unabhängig vom Geschlecht (32,58,61,65,73,212,223) und nach der Pubertät auch vom Alter (58,59,60,65,66,253,258). Sie unterliegt keiner Tagesrhythmik (58,212) und wird durch Stressbedingungen nicht beeinflusst (213). Erniedrigte Werte finden sich beim seltenen Bild des familiären idiopathischen CBG-Mangels (59,65,68,74,271), bei Hypoproteinämien unterschiedlicher Ätiologie (43,44,58,64,73,258) und bestimmten Formen des Cushing-Syndroms (62,66,73). Eine erhöhte Transcortin-Bindungskapazität läßt sich praktisch nur beim Lungenkarzinom nachweisen (58,73). Störungen der Gonadenfunktion bleiben ohne Einfluß auf die CBG-Synthese (65,66,73). Auch andere Krankheitsbilder gehen nicht mit einer Veränderung des Transcortin-Gehalts einher (58,66,73,213). Das nach Applikation von METOPIRON^(R) und Testosteron festgestellte Absinken der CBG-Werte beruht nicht auf einer echten Beeinflussung der Synthese, sondern vielmehr auf einer kompetitiven Verdrängung von Cortisol aus der Eiweißbindung (65,66,67,253,271). Da die Bindungskapazität als indirektes Kriterium der Transcortin-Produktion dient, kommt es unter diesen Umständen zu einer methodisch bedingten Verfälschung der Meßergebnisse. Therapeutische Gaben von originärem Progesteron (174,175) wie die Applikation anderer östrogen-unwirksamer Pharmaka verursachen keine Alteration der CBG-Konzentration (58,65,66,212,253). Die Auswirkungen einer Clomiphen-Behandlung auf diesen Parameter sind zur Zeit noch umstritten (39,65,66,187).

Die Transcortin-Synthese ist eindeutig östrogenabhängig im Sinne einer erheblichen Steigerung. Zwar vermag die physiologische Zunahme der Östrogensekretion während des Menstruationszyklus keine Erhöhung des CBG-Spiegels auszulösen (32,213), aber die Verabfolgung von Östrogenpräparaten in pharmakologischer Dosierung resultiert in einem Kapazitätsanstieg bis auf das Zwei- bis Dreifache der Norm bei unver-

änderter Affinität (48,50,51,52,74,76,205,209,212,234, 256,258,262,280,297). Dasselbe Phänomen ist im Verlauf der Schwangerschaft zu beobachten (12,32,48,51,58,65, 66,73,77,159,174,175,178,179,205,207,209,213,223,228, 248,253,254,255,256,261,271,272,273,274,280,297,302, 313,314). Obwohl der Gesamt-Cortisolgehalt im Blut dabei teilweise im Größenordnungsbereich des Cushing-Syndroms liegt, bleiben klinische Symptome einer Nebennierenüberfunktion aus. Das ist in erster Linie auf die im Gegensatz zum Hyperkortizismus vermehrte Transcortin-Bindungskapazität zurückzuführen, die eine wesentliche Zunahme der biologisch allein wirksamen angebundenen Cortisolfraktion verhindert (12,35,51,58,77,201,231, 236,242,253,258,297,317).

3. METHODISCH-EXPERIMENTELLER TEIL

5.1. VORBEMERKUNGEN

3.1.1. Transcortin-Bindungskapazität: Bestimmungsverfahren
In der Literatur werden eine Reihe von Methoden zur Bestimmung der Transcortin-Aktivität im menschlichen Plasma angegeben. Zu den gebräuchlichsten Verfahren zählt neben der Äquilibriumdialyse (43,48,50,52,123, 124,212,258,280,309,311) die Gelfiltration mit Sephadex (29,30,58,73,144,212,283). Außerdem bedient man sich der Ultrafiltration (34,159,207,208,213,227,305), der Papierelektrophorese (42,46,223) und Polyacrylamid-Gelelektrophorese (37) sowie immunologischer (7) und enzymatischer Techniken (11,178). Ferner finden verschiedene kompetitive Adsorptionsmethoden Verwendung (60,111,142,143,187,202,226,228,234,302).

Bei der Wahl eines geeigneten Bestimmungsprinzips müssen als entscheidende Kriterien Aussagevermögen und Praktikabilität gelten.

Die Äquilibriumdialyse liefert thermodynamisch exakte Informationen über sämtliche Bindungsparameter, Affinität wie Kapazität (253,313,314). Zudem gestattet sie die quantitative Differenzierung zwischen spezifisch Transcortin-gebundenem, unspezifisch Albumin-gebundenem und ungebundenem Steroidanteil (240,313,314). Der Material- und Zeitaufwand dieses Verfahrens ist allerdings erheblich (144,165,302).

Die Gelfiltrations-Methode basiert auf der Trennung der Cortisolfraktionen in einem sich kontinuierlich verändernden System, das durch den Zustand eines Non-Äquilibriums gekennzeichnet ist (29,30,302,313,314). Ihre Aussagemöglichkeiten bleiben auf die ausschließliche Bestimmung der Transcortin-Bindungskapazität beschränkt (73,240). Diese Technik erfordert die strikte Einhaltung konstanter Versuchsbedingungen; sie zeichnet sich aber durch einen geringen Arbeitsaufwand aus (253,313,314).

Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß von den physiko-chemischen Parametern, mit deren Hilfe die Cortisol-Protein-Bindung charakterisiert werden kann, allein die Transcortin-Bindungskapazität östrogenabhängig ist (60, 297), entschlossen wir uns bei der gesetzten klinischen Fragestellung aus Gründen der Praktikabilität für die Gelfiltrations-Methode.

3.1.2. Isotopen-Gelfiltration: Theoretische Grundlagen

Die Anwendung des Gelfiltrations-Verfahrens zur Bestimmung der Transcortin-Bindungskapazität beruht auf der Feststellung, daß die Trennung des Protein-Steroid-Komplexes von der ungebundenen Steroidfraktion infolge der unterschiedlichen Molekülgröße möglich ist (113, 239). Während der Transcortin-Cortisol-Komplex bei 4°C ohne relevante Dissoziation eluiert werden kann (73), kommt es auf Grund der relativ geringen Cortisol-affinität von Albumin zur praktisch vollständigen Dissoziation des Albumin-Cortisol-Komplexes bei dieser Temperatur (58; s.a. Tab.2). Folglich erscheint Albumin in der schneller wandernden Eiweißfraktion gemeinsam mit dem Transcortin-Cortisol-Komplex. Dagegen wird das ursprünglich Albumin-gebundene Cortisol zusammen mit dem ungebundenen Cortisol verzögert eluiert.

Die quantitative Erfassung der Transcortin-Bindungskapazität im Plasma erfordert eine Sättigung der noch unbesetzten CBG-Bindungsstellen. Diese erfolgt durch Inkubation der Probe mit einer genau definierten Menge an radioaktiv-markiertem und nicht-markiertem Cortisol (73). Die vorgegebene Radioaktivität läßt sich mit Hilfe der Gelfiltration in zwei voneinander getrennten Fraktionen eluieren und ermöglicht damit die Identifikation des spezifisch-gebundenen Steroidanteils. Der erste Peak deckt sich mit der Eiweißfraktion und entspricht dem Transcortin-gebundenen Cortisol; der zweite Radioaktivitätspeak repräsentiert den ungebundenen und den ursprünglich Albumin-gebundenen Cortisolanteil (s. Abb. 1 und Abb.4).

Nach Bestimmung des gebundenen endogenen Cortisolanteils kann bei bekannter spezifischer Aktivität der Sättigungslösung die Transcortin-Bindungskapazität ermittelt werden (58,73).

3.2.

METHODISCHE AUFGABENSTELLUNG

Die Verwendung der von DE MOOR et al. (58) sowie DOE u.a. (73) entwickelten Gelfiltrations-Technik gewährleistet die Messung der Transcortin-Bindungskapazität relativ unabhängig von einer Beeinflussung durch Albumin. Allerdings bleiben mit dieser Methode gewisse Nachteile hinsichtlich Spezifität, Richtigkeit und Praktikabilität verbunden:

- a) die aufwendige und unzuverlässige kolorimetrische bzw. fluorometrische Bestimmung der körpereigenen Cortisolkonzentration (69,230) und
- b) die Möglichkeit einer kompetitiven Cortisolverdrängung von den CBG-Bindungsstellen durch konkurrierende Steroide in vitro wie z.B. Progesteron (64,67,76,248,253,255,256,271,313,314).

Im methodisch-experimentellen Teil dieser Studie wird eine vom Autor ausgearbeitete Modifikation des Gelfiltrations-Verfahrens beschrieben, mit deren Hilfe sich die obengenannten Schwierigkeiten umgehen lassen.

3.3.

CHEMIKALIEN UND GERÄTE

3.3.1. Reagenzien

Alle Reagenzien - mit Ausnahme von Sephadex G-50 Medium (Dt.Pharmacia, Frankfurt/Main) und Norit A (Serva, Heidelberg) - wurden von der Fa.E.Merck (Darmstadt) bezogen.

1. Phosphatpufferlösung nach SØRENSEN (285):
di-Natriumhydrogenphosphat 2-hydrat p.A.,
Kaliumdihydrogenphosphat krist. rein.
2. Szintillatorflüssigkeit nach BRAY (17):
redestilliertes Methanol p.A., Äthylenglycol p.A.,

Dioxan p.A., Naphthalin, 2,5-Diphenyloxazol (PPO),
2,2'-p-phenylen-bis-(5-phenyloxazol) (POPOP).

3. Temperierflüssigkeit:

Glyzerin DAB 7, Formaldehydlösung 35 Gew.% p.A.

3.3.2. Lösungsmittel

Alle benutzten Lösungsmittel (Chloroform, Äthanol, Benzol) stammten von der Fa.E.Merck (Darmstadt), besaßen p.A.-Reinheitsgrad und wurden vor Gebrauch destilliert.

3.3.3. Steroide

1. Cortisol-4-C¹⁴ (Radiochemical Centre, Amersham, England; radiochemischer Reinheitsgrad: 96-99%; spezifische Aktivität: 159 µCi/mg) wurde vor Gebrauch mittels Dünnschichtchromatographie (System Chloroform/Äthanol 80/20) gereinigt und mit Benzol/Äthanol 90/10 eluiert.
2. Cortisol als Reinstsubstanz (Schering, Berlin) wurde ohne weitere Vorreinigung verwendet.

3.3.4. Proteine

1. Albumin-J¹³¹ (Hoechst, Frankfurt/Main; Reinheitsgrad: 98%; spezifische Aktivität: 25 µCi/mg).
2. Human-Albumin RH 20 als Trockensubstanz (Behringwerke, Marburg/Lahn; elektrophoretischer Reinheitsgrad: 100%).

3.3.5. Geräte

Für alle Bestimmungen verwandten wir reine Glasapparaturen. Folgende Geräte wurden benutzt:

1. Feinwaage Type 2432 (Sartorius, Göttingen),
2. pH-Meter (Knick, Berlin),
3. Berthold-Scanner (Berthold, Wildbad),
5. Ölpumpe Mivac (Leybold, Köln),
6. Wasserbad mit Schüttelvorrichtung Type 3047 (Köttermann, Hänigsen),
7. Zentrifuge (Stock, Marburg),
8. Kühlzentrifuge Servall Refrigerated-Automatic (Servall, Heidelberg; Leihgabe der Deutschen Forschungsgemeinschaft Nr. 100/386/61),

9. Chromatographierohre K 9/30 und K 25/45 M mit Temperiermantel (Dt.Pharmacia, Frankfurt/Main),
10. Tauchkühler TK 64 (Colora, Lorch/Württ.),
11. Ultra-Thermostat HT 13 (Colora, Lorch/Württ.),
12. Mikropumpe mp 1 (Bühler, Tübingen),
13. Fraktionensammler UltroRac LKB 7000 (Colora, Lorch/Württ.),
14. Photometer LKB 8300 A Uvicord II mit LKB Recorder 6520 H (Colora, Lorch/Württ.),
15. Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer Modell 3380 (Packard, Frankfurt/Main).

3.4.

ENDGÜLTIGE ARBEITSVORSCHRIFT

3.4.1. Ansatz der Sättigungslösung

Das gereinigte Cortisol-4-C¹⁴ wird mit Benzol/Äthanol 90/10 so verdünnt, daß 0,5 ml dieser Stammlösung A 0,200 µCi Radioaktivität und (bei einer spezifischen Aktivität von 159 µCi/mg) 1,258 µg Cortisol enthalten. Das nicht-markierte Cortisol wird in Benzol/Äthanol 90/10 zu einer Konzentration von 0,742 µg pro 0,5 ml der Stammlösung B gelöst. Man pipettiert je 0,5 ml der Stammlösungen A und B in ein Schliffgläschen und bewahrt diese Gebrauchslösung bis zur Verwendung luftdicht verschlossen im Kühlschrank auf, um den Grad der Cortisol-Dekomposition auf ein Minimum zu reduzieren (144,165,211,313,314,315). Die Radioaktivität (dpm) der Sättigungs-Gebrauchslösung wird mittels Flüssigkeits-Szintillationstechnik ermittelt (Vierfachbestimmungen).

3.4.2. Ansatz des Phosphatpuffers (285)

Die Gebrauchslösung mit einem pH von 7,4 bei 18°C setzt sich zusammen aus 804 ml einer 1/15 molaren Dinatriumphosphat-Stammlösung (11,88 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O pro Liter doppelt-destilliertes, entsalztes Wasser) und 196 ml einer 1/15 molaren Monokaliumphosphat-Stammlösung (9,08 g KH₂PO₄ pro Liter doppelt-destilliertes, entsalztes Wasser).

3.4.3. Vorbereitung des Sephadex-Gels, Packen der Säule

10 g trockenes Sephadex G-50 Medium (ca. 5 ml Wasseraufnahme und ca. 10 ml Gelvolumen pro g) werden in 100 ml Phosphatpuffer eingerührt. Mit dieser Menge lassen sich bequem vier Säulen (9 x 300 mm) füllen. Zum vollständigen Durchquellen setzt man die Suspension für mindestens eine Stunde in ein siedendes Wasserbad. Anschließend werden kleine Partikel ("fines") und Verunreinigungen nach Aufrühren des Gels mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Vor dem Packen der Säule entlüftet man das Gel durch Evakuieren.

Vier Chromatographierohre K 9/30 (Durchmesser 9 mm) werden bis zu einer Höhe von 27 cm mit gequollenem Sephadex gefüllt. Dabei ist auf gleichmäßiges Sedimentieren zu achten und das Auftreten von Luftblasen im Gelbett zu verhindern. Die fertig gepackten Säulen werden zum Stabilisieren der Füllung mit 100 ml Puffer vorgespült (Durchlaufgeschwindigkeit: 1 ml pro Minute). Die Aufbewahrung erfolgt unter luftdichtem Verschuß bei Raumtemperatur ohne Zusatz eines Konservierungsmittels. Die Säulen können bis zu 100 mal wiederverwendet werden (58).

3.4.4. Ansatz der Szintillatorflüssigkeit (17)

Man versetzt 60 g Naphthalin, 4 g PPO und 0,2 g POPOP mit 100 ml Methanol und 20 ml Äthylenglycol. Die Lösung wird mit Dioxan auf 1000 ml aufgefüllt.

3.4.5. Gewinnung, Aufarbeitung und Aufbewahrung der Proben

Für eine Doppelbestimmung werden 20 ml Blut aus der Kubitalvene entnommen, mit 1,0 ml Vetren^(R) (Promonta, Hamburg; = 100 I.E. Heparin-Natrium) versetzt und dann 10 min. bei Raumtemperatur zentrifugiert (3000 rpm). Die Aufbewahrung des Plasmas bis zur Aufarbeitung erfolgt in gefrorenem Zustand bei -20°C.

5.4.6. Entfernung der Steroide ("stripping") (142)

Nach dem Auftauen und dem Abzentrifugieren von Fibrin-niederschlägen werden 4,0 ml Plasma mit 200 mg Aktivkohle Norit A versetzt und 30 min. bei 46°C im Wasserbad geschüttelt. Anschließend entfernt man das Adsorbens durch zweimaliges Zentrifugieren (4000 rpm; je 10 min. bei 4°C) und Filtrieren (Schleicher & Schüll Filterpapier Nr. 595).

5.4.7. Sättigung der Transcortin-Bindungsstellen (73)

1,0 ml der Sättigungs-Gebrauchslösung (Mischung von markiertem und nicht-markiertem Cortisol, entsprechend 0,200 µCi Radioaktivität und 2,000 µg Cortisol) wird im warmen Sandbad mit Stickstoff bis zur Trockene eingengt. Dazu pipettiert man 2,0 ml steroidfreies Plasma und inkubiert die Probe unter vorsichtigem Schütteln 60 min. im Wasserbad (37°C). Vor der Säulenchromatographie wird das Plasma auf 4°C abgekühlt (mindestens 1 Stunde).

5.4.8. Isolierung der Transcortin-gebundenen Cortisolfraktion

Man tropft 0,3 ml steroidfreies, mit Cortisol gesättigtes Plasma auf die Sephadex-Säule, wäscht zweimal mit je 0,5 ml Phosphatpuffer nach und eluiert die Probe bei 4°C und einer Durchflußgeschwindigkeit von 1 ml pro min. Das Eluat wird in 1-ml-Portionen direkt in Packard-Gläschen gesammelt. Den Eiweißgehalt der einzelnen Fraktionen bestimmt man photometrisch durch Messung der Ultraviolett-Absorption bei 280 nm. Nach Elution der Eiweißfraktion muß die Säule mit 40 ml Phosphatpuffer gewaschen werden, bevor sie erneut zu verwenden ist.

5.4.9. Radioaktivitäts-Bestimmung

Diejenigen Fraktionen, deren Ultraviolett-Durchlässigkeit T ("transmittance") 100% unterschreitet, werden mit je 10 ml Szintillatorflüssigkeit versetzt und im

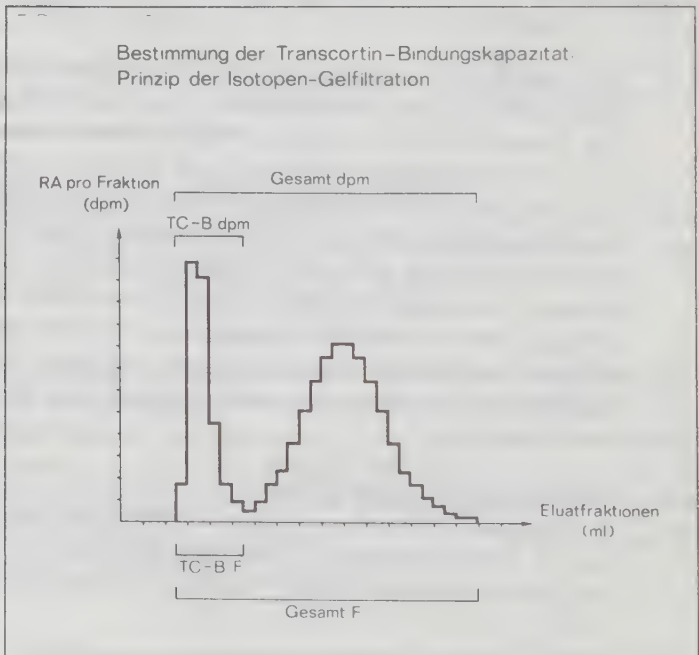
Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer gemessen. Unter Berücksichtigung von Null- und Quencheffekt läßt sich die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen in dpm (Zerfällen pro Minute) ermitteln.

3.4.10. Transcortin-Bindungskapazität: Berechnung

Ausgegangen wird von der Überlegung, daß sich der Gesamt-Cortisolgehalt (Gesamt F) zur Gesamt-Radioaktivität der gesättigten Plasmaprobe (Gesamt dpm) verhält wie der Transcortin-gebundene Cortisolanteil der Probe (TC-B F) zur Radioaktivität der, bei der Gelfiltration isolierten eiweißhaltigen Fraktionen (TC-B dpm; s. Abb. 1):

- (a) $\text{Gesamt F} / \text{Gesamt dpm} = \text{TC-B F} / \text{TC-B dpm}$;
- (b) $\text{TC-B F} = \text{TC-B dpm} \times \text{Gesamt F} / \text{Gesamt dpm}$.

Abb. 1



Mithin läßt sich die Transcortin-Bindungskapazität der Probe nach folgender Gleichung berechnen:

$$(c) \quad TC-BC = TC-B \text{ dpm} \times 1/SA \times K.$$

TC-BC :	Transcortin-Bindungskapazität (μg Transcortin-gebundenes Cortisol pro 100 ml Plasma)
TC-B dpm :	Radioaktivität der eiweißhaltigen Fraktionen (dpm pro Probevolumen)
1/SA :	reziproker Wert der spezifischen Aktivität der Sättigungs-Gebrauchslösung; er entspricht dem Quotienten Gesamt F/Gesamt dpm (μg Cortisol pro dpm)
K :	Korrekturfaktor zur Umrechnung vom Probevolumen (0,3 ml) auf 100 ml Plasma

3.5.

METHODISCH-EXPERIMENTELLE ERGEBNISSE

Anmerkung: Zur Bestimmung der Transcortin-Bindungskapazität wurde grundsätzlich die endgültige Arbeitsvorschrift (s. Abschnitt 3.4.) angewandt. Nur die von ihr abweichenden Versuchsbedingungen werden im folgenden Abschnitt ausdrücklich aufgeführt. Sämtliche angegebenen Ergebnisse stellen Mittelwerte aus je zwei Einzelmessungen derselben Probe dar.

3.5.1. Gewinnung, Aufarbeitung und Aufbewahrung der Proben

Die Transcortin-Bindungskapazität zeigte keine Tageschwankungen (s. Tab. 3). Ebenso blieb die postprandiale Hyperlipidämie (milchige Plasmatrübung) ohne Einfluß auf die Bindungskapazität. Auf einen festgelegten Zeitpunkt der Blutentnahme wurde daher verzichtet.

Keine Unterschiede ergaben sich bei Vergleichsbestimmungen von Serum und heparinisiertem Plasma. Dagegen war die Bindungskapazität von Blutkonserven (über längere Zeit eingefrorenes Zitratplasma) deutlich erniedrigt ($TC-BC: 15,2 \pm 1,1 \mu\text{g}\%$; $n=4$). Die Einfrierdauer selbst hatte keinen Effekt auf das Bindungsvermögen von heparinisiertem Plasma. Im Standardverfahren wurden heparinisierte Plasmaproben nach höchstens halbjähriger Aufbewahrung analysiert.

Tab.5: Transcortin-Bindungskapazität in Abhängigkeit von der Gewinnung, Aufarbeitung und Aufbewahrung des Untersuchungsmaterials

a) Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Probengewinnung

Abnahme	TC-BC (µg%)			
	N 1	G 1	N 2	G 2
8 Uhr	23,9	51,3	-	-
12 Uhr	25,2	53,6	-	-
16 Uhr	24,8	54,6	-	-
nüchtern	-	-	26,5	58,5
postprandial	-	-	26,6	57,3

b) Abhängigkeit von der Aufarbeitungsart

Probe	TC-BC (µg%)			
	N 3	N 4	G 3	G 4
Serum	20,8	23,0	48,2	53,9
hep.Plasma	19,9	23,7	45,4	55,9

c) Abhängigkeit von der Aufbewahrungsdauer

Zeitpunkt der Best.	TC-BC (µg%)			
	N 5	N 6	G 5	G 6
sofort	25,9	20,5	51,8	49,0
nach 1 Mo.	26,7	20,8	51,4	53,1
nach 8 Mo.	25,2	22,3	53,2	51,6

Abk.: TC-BC = Transcortin-Bindungskapazität;
 N 1-6 = Proben männlicher Versuchspersonen;
 G 1-6 = Proben von Schwangeren (3.Trimester).

3.5.2. Entfernung der Steroide ("stripping")

Der Ausschluß einer potentiellen in-vitro-Cortisol-verdrängung von den CBG-Bindungsstellen durch konkurrierende Steroide und der Verzicht auf die Bestimmung des körpereigenen Cortisols bei der Messung der Transcortin-Bindungskapazität erfordern die Entfernung der Steroide vor dem Sättigungsschritt. Zwei verschiedene Verfahren wurden hinsichtlich ihrer Effizienz und Praktikabilität miteinander verglichen.

Die Gelfiltration bei 46°C von Cortisol-4-C¹⁴-gesättigtem Plasma führt zu einer fast vollständigen Entfernung des markierten Steroids aus der eiweißhaltigen Fraktion (Wiederfindung: $4,9 \pm 1,3\%$; n=4).

Cortisol-4-C¹⁴-gesättigtes Plasma (Sättigungsdosis: 200 µg pro 100 ml Plasma) wurde mit Aktivkohle (Norit A) in unterschiedlicher Konzentration bei Raumtemperatur bzw. 46°C im Wasserbad unter leichtem Schütteln inkubiert. Das Adsorbens entfernten wir durch zweimaliges Zentrifugieren und Filtrieren. Die Radioaktivität der Proben wurde vor und nach der Behandlung mit Aktivkohle bestimmt. Tab.4 zeigt, daß die Inkubation mit 50 mg Norit A pro ml Plasma bei 46°C eine praktisch vollständige Adsorption des markierten Cortisols bewirkt (Wiederfindung: 1,7%).

Tab.4: Entfernung von Cortisol-4-C¹⁴ mittels Adsorption an Aktivkohle in Abhängigkeit von der Norit-A-Konzentration und der Inkubationstemperatur (Inkubationsdauer: jeweils 30 min.)

Norit-A-Konzentration (mg/ml Plasma)	Cortisol-4-C ¹⁴ -WF	
	bei RT	bei 46°C
25 mg/ml	7,6%	4,2%
50 mg/ml	5,7%	1,7%
100 mg/ml	5,3%	1,6%

Abk.: WF = Wiederfindung; RT = Raumtemperatur.

Eine Inkubationsdauer von 30 Minuten war ausreichend, um den oben beschriebenen "stripping"-Effekt herbeizuführen (Norit-A-Konzentration: 50 mg/ml Plasma; Inkubationstemperatur: 46°C): bereits nach 5 min. lag die Cortisol-4-C¹⁴-Wiederfindung bei nur 3,2%, sie sank nach 15 min. auf 2,2%, nach 30 min. betrug sie 1,7%. Eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 60 min. erbrachte keine weitere Verbesserung der Effizienz (Wiederfindung der vorgegebenen Radioaktivität: 1,6%).

Neben Steroiden wird in geringem Umfang auch Eiweiß an Aktivkohle adsorbiert: nach Äquilibrierung von jeweils 4 ml Plasma und 0,1 μCi Albumin- J^{131} (gelöst in NaCl: 1 μCi pro ml Kochsalzlösung) und 30minütigem Schütteln der Proben mit je 200 mg Norit A bei 46°C stellten wir eine durchschnittliche Wiederfindung des markierten Proteins von $95,7 \pm 1,0\%$ fest ($n=4$).

Ein indirekter Methodenvergleich zeigt (s.Tab.5), daß die Art des "stripping"-Verfahrens ohne Einfluß auf die CBG-Bindungseigenschaften bleibt. In 6 Parallelansätzen bestimmten wir - nach Anwendung der Adsorptionstechnik bzw. der Gelfiltration bei 46°C zur Steroidentfernung und erneuter Sättigung der steroidfreien Plasmaproben mit Cortisol - die Transcortin-Bindungskapazität durch Isotopen-Gelfiltration bei 4°C . Dabei ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede bezüglich der erfaßten Kapazitäts-Endwerte.

Tab.5: Transcortin-Bindungskapazität in Abhängigkeit von der Art des angewandten "stripping"-Verfahrens
(Sättigungs-dosis: 200 μg Cortisol pro 100 ml Plasma)

Plasma	TC-BC ($\mu\text{g}\%$)	
	Aktivkohle	GF bei 46°C
N 1	27,0	26,1
N 2	24,9	22,5
N 3	25,3	27,3
G 1	65,5	68,7
G 2	67,0	63,1
G 4	61,7	57,9

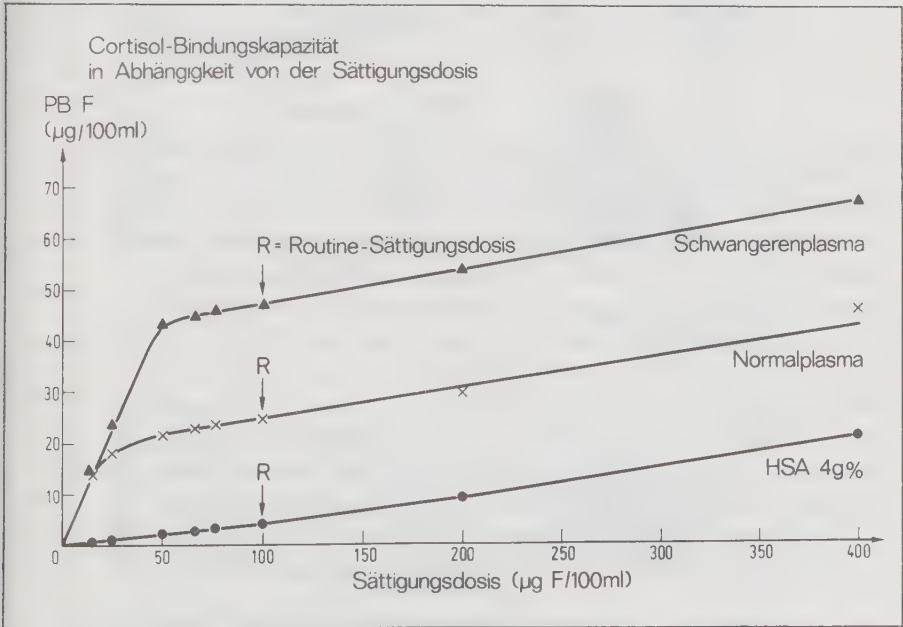
Abk.: GF = Gelfiltration;
N 1-3 = Plasma männlicher Versuchspersonen;
G 1-3 = Plasma von Schwangeren (3.Trimester).

Auf Grund des geringeren Material- und Zeitaufwandes wie des relativ besseren "stripping"-Effekts benutzten wir die Adsorptionsmethode zur routinemäßigen Entfernung der endogenen und exogenen Steroide.

3.5.3. Sättigung der Transcortin-Bindungsstellen

Zur Festlegung der optimalen Sättigungsdosis untersuchten wir die Abhängigkeit der Cortisol-Bindungskapazität (F-BC) von der Menge an radioaktiv-markiertem und nicht-markiertem Cortisol, mit der die steroidfreie Probe äquilibriert wird. Dabei stellte sich heraus (s.Abb.2), daß die Bindungskapazität mit steigender Cortisoldosis (14,4 - 24,8 - 49,6 - 66,2 - 76,3 - 99,3 - 198,6 und 397,2 µg Cortisol pro 100 ml Plasma einer männlichen Versuchsperson bzw. einer Schwangeren im 3.Trimester) zunimmt, ohne einen Plateauwert zu erreichen.

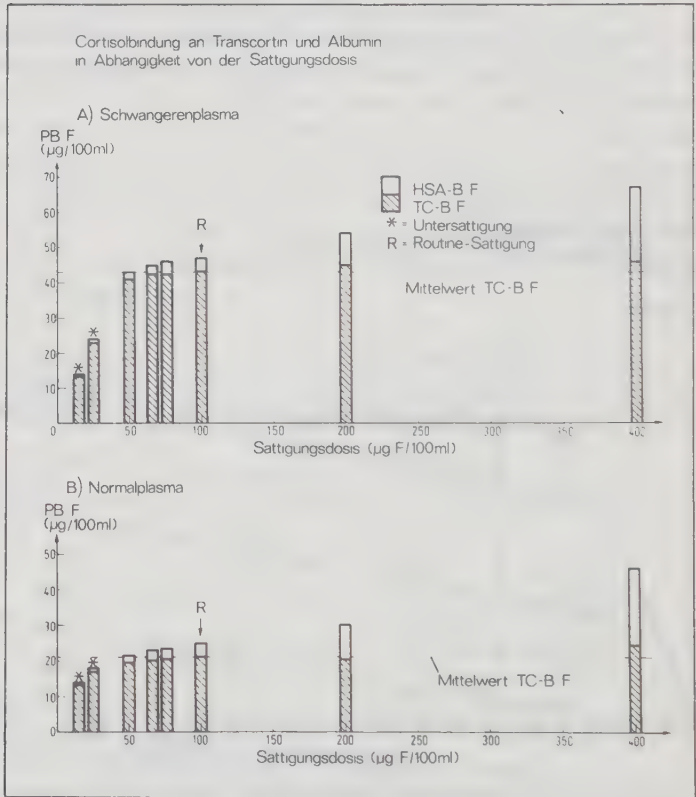
Abb.2



Der gleiche Effekt ließ sich bei der Gelfiltration einer mit Cortisol gesättigten HSA-Lösung (4 g%; kristallines Human-Serum-Albumin gelöst in Phosphatpuffer pH 7,4) demonstrieren.

Berücksichtigt man den Albumin-gebundenen Cortisolanteil bei der Berechnung der Transcortin-Bindungs Kapazität, indem man die F-BC-Werte der HSA-Lösung von denen des normalen bzw. Spätschwangerenplasma subtrahiert, so zeigt sich, daß die Durchschnittswerte des mutmaßlich Transcortin-gebundenen Cortisols trotz unterschiedlicher Sättigungsdosis nicht signifikant differieren (s. Abb. 3).

Abb. 3



Für die Routinebestimmungen verwandten wir eine Sättigungsdosis von 100 μg Cortisol pro 100 ml Plasma, einerseits um die Sättigung der CBG-Bindungsstellen zu gewährleisten, andererseits um die Cortisol-Bindung an Albumin auf ein Minimum zu reduzieren.

Aus Tab.6 geht hervor, daß die von uns gewählte Inkubationszeit (60 Minuten) ausreicht, um eine Sättigung der Transcortin-Bindungsstellen bei 37°C herbeizuführen.

Tab.6: Transcortin-Bindungskapazität in Abhängigkeit von der Sättigungsdauer
(Sättigungsdosis: 200 µg Cortisol pro 100 ml Plasma)

Sättigungs- dauer	TC-EC (µg%)	
	N	OC
5 min.	26,4	56,4
10 min.	23,7	56,3
20 min.	27,0	61,3
60 min.	26,3	57,2

Abk.: N = Plasma einer männlichen Versuchsperson;
OC = Plasma einer mit Ortho-Novum 1/50 behandelten Patientin.

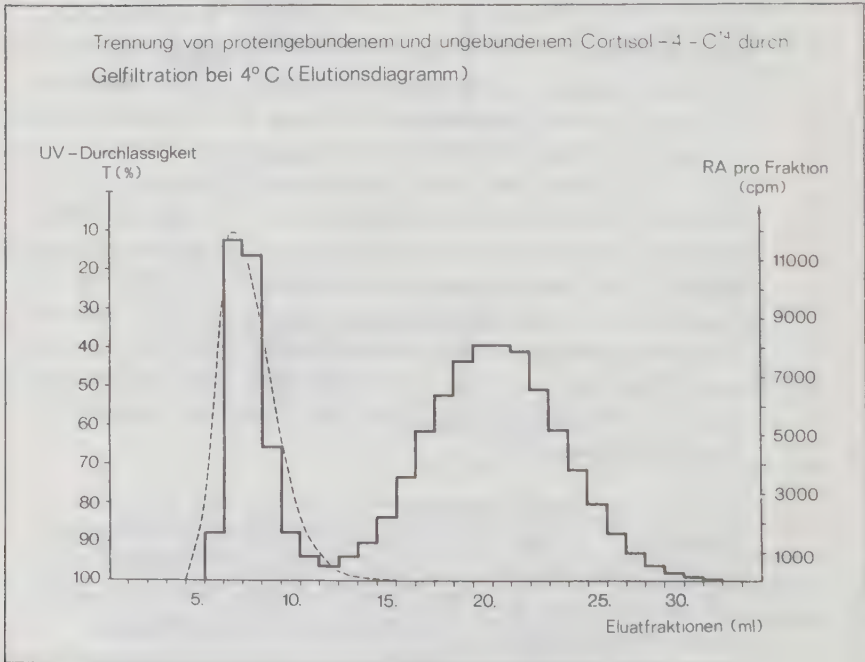
5.5.4. Isolierung der Transcortin-gebundenen Cortisolfraktion
Die Gelfiltration der mit Cortisol-4-C¹⁴ gesättigten Plasmaprobe bei 4°C ermöglicht die Trennung des Protein-Steroid-Komplexes von dem ungebundenen Steroidanteil (s.Abb.4). Nach dem äußeren Volumen der Sephadex-Packung (= Puffervolumen außerhalb der gequollenen Gelpartikel; ca. 5 ml) folgt der erste Radioaktivitätspeak (6.-11.ml). Er deckt sich mit der photometrisch bestimmten Eiweißfraktion und entspricht dem protein-gebundenen Cortisolanteil. Der zweite Radioaktivitätspeak (13.-30.ml) ist identisch mit dem ungebundenen Cortisolanteil, der infolge seiner geringeren Molekülgröße verzögert eluiert wird. Die Cortisol-4-C¹⁴-Wiederfindung lag im Durchschnitt zwischen 98 und 100%; sie fiel nie unter 97% (60 Bestimmungen).

Bei der Säulenchromatographie von Plasma, das mit Albumin-J¹³¹ ohne Zusatz von markiertem Cortisol äquilibriert worden war (0,1 µCi Albumin-J¹³¹ gelöst in 0,1 ml NaCl pro 4 ml Plasma), erschien die Radioaktivität ausschließlich im Bereich des ersten Peaks (Wiederfindung 97%; 2 Bestimmungen). Wurde dagegen eine

Cortisol-4- C^{14} -Lösung filtriert (0.2 μ Ci Radioaktivität pro 2 ml Phosphatpuffer pH 7,4), befand sich das markierte Steroid nur in Position des zweiten Peaks (Wiederfindung 98%; 4 Bestimmungen).

Im Standardverfahren wurde das äußere Volumen (Ultraviolett-Durchlässigkeit $T = 100\%$) verworfen. Die folgenden zehn 1-ml-Portionen untersuchten wir auf ihren Radioaktivitätsgehalt. Damit war die Erfassung des eiweiß-gebundenen Cortisolanteils unter Einbeziehung der die beiden Peaks trennenden Fraktion gewährleistet. Die restliche, ungebundene Radioaktivität wurde mit 40 ml Puffer aus dem Gelbett gewaschen und ebenfalls verworfen. Anschließend war die Säule erneut einsatzbereit; sie wurde bis zu fünfzig mal benutzt, ohne ihre Trennfähigkeit zu verlieren.

Abb.4



Die Anwendung der Isotopen-Gelfiltration zur spezifischen Bestimmung der Transcortin-Bindungskapazität setzt voraus, daß die relativ geringe Cortisol-Affinität von Albumin bei 4°C zu einer vollständigen Dissoziation des Albumin-Cortisol-Komplexes während der Säulenchromatographie führt. Unsere Experimente zeigten allerdings, daß ein kleiner Cortisolanteil auch bei dieser Temperatur unspezifisch an Albumin gebunden bleibt und daher bei der Bestimmung der eiweiß-gebundenen Radioaktivität mit-erfaßt wird. Das Ausmaß der Cortisol-Residualbindung an Albumin hängt von der Höhe der Sättigungsdosis ab (s. Abschnitt 5.5.3.; Abb.2).

Tab.7: Cortisol-Bindungskapazität von Albuminlösungen in Abhängigkeit von der HSA-Konzentration und der Sättigungsdosis

Sättigungs- dosis (µg F/100 ml)	CBC (µg%)		
	HSA 8g%	HSA 4g%	HSA 2g%
400 µg%	18,2	21,2	13,8
200 µg%	9,8	9,1	6,6
100 µg%	4,4	3,8	3,4
50 µg%	2,2	2,0	1,3

Abk.: CBC = Cortisol-Bindungskapazität; F = Cortisol.

Tab.8: Cortisol-Bindungskapazität von menschlichem Plasma in Abhängigkeit von der Albuminkonzentration (Sättigungsdosis: 200 µg Cortisol pro 100 ml Plasma)

Zugegebene HSA-Menge	CBC (µg%) N	Zugegebene HSA-Menge	CBC (µg%) G
-	29,7	-	68,7
0,2 g%	30,8	2,0 g%	67,0
0,4 g%	29,6	4,0 g%	67,0
0,8 g%	28,9	8,0 g%	65,5

Abk.: N = Plasma einer männlichen Versuchsperson;
G = Plasma einer Schwangeren (3.Trimester).

Die Elution von eingewogenen HSA-Lösungen (2,4 und 8g%: kristallines Human-Serum-Albumin gelöst in Phosphatpuffer pH 7,4) ergab, daß dieser Effekt durch eine Zunahme der Albuminkonzentration nur geringgradig verstärkt wird (s.Tab.7). Auch die in-vitro-Erhöhung der Albuminkonzentration von Plasmaproben durch Zugabe von kristallinem HSA führte zu keiner signifikanten Änderung der Cortisol-Bindungskapazität (s.Tab.8).

In einem weiteren Versuch wurde Transcortin durch eine 30minütige Inkubation bei 60°C selektiv und irreversibel inaktiviert. Diesen Schritt führten wir nach Entfernung der Steroide aus dem Plasma durch, um eine Hemmung der CBG-Denaturierung durch körpereigenes Cortisol zu verhindern (73,235,253,313). Die Analyse der eiweißgebundenen Cortisolfraktion nach Sättigung der Probe und Gelfiltration bei 4°C zeigte, daß - unabhängig von der Höhe des ermittelten TC-BC-Endwertes - das Ausmaß der Cortisol-Residualbindung an Albumin als konstant angesehen werden kann. Sie betrug bei einer männlichen Versuchsperson 4,1 µg% (TC-BC: 19,3 µg%) und bei einer Schwangeren im 2.Trimester 3,9 µg% (TC-BC: 39,0 µg%).

Auf Grund der Tatsache, daß bei der gewählten Sättigungsdosis der mitgemessene HSA-gebundene Cortisolanteil gering und von physiologischen Schwankungen der Plasma-Albuminkonzentration wie der Höhe des CBG-Spiegels unabhängig ist, verzichteten wir bei den klinischen Vergleichsstudien darauf, einen Albumin-Korrekturfaktor bei der Bestimmung der Transcortin-Bindungskapazität einzuführen.

Die Vollständigkeit der Erfassung der CBG-gebundenen Steroidfraktion hängt vom Grad der Dissoziation des Transcortin-Cortisol-Komplexes während der Säulenchromatographie ab.

Temperatursteigerungen bewirken eine Zunahme der Dissoziation und infolgedessen ein Absinken der Bindungskapazität (s.Tab.9). Sie führen zu einer reversiblen Aufhebung der Cortisol-Bindung an Transcortin bei 46°C (s. Abschnitt 3.5.2.).

Tab.9: Transcortin-Bindungskapazität in Abhängigkeit von der Elutionstemperatur
(Sättigungsdosis: 400 µg Cortisol pro 100 ml Plasma)

Elutions- temperatur	TC-BC (µg%)	
	N	G
4°C	45,8	67,0
37°C	27,2	40,4

Abk.: N = Plasma einer männlichen Versuchsperson;
G = Plasma einer Schwangeren (3.Trimester).

Eine völlige Aufhebung der kontinuierlichen Dissoziation während der Gelfiltration ist auch bei 4°C nicht zu erreichen. Das Elutionsdiagramm (Abb.4) zeigt, daß die Radioaktivität zwischen den beiden Peaks nicht auf Null absinkt. Allerdings ist die Dissoziation des Transcortin-Cortisol-Komplexes bei 4°C von so geringem Ausmaß, daß sie vernachlässigt werden kann:

Nach Bestimmung der Bindungskapazität eines Schwangerenplasmas re-eluierten wir einen aliquoten Teil des eiweiß-gebundenen Radioaktivitätspools; sie erschien ausschließlich im Bereich des ersten Peaks; die TC-BC-Werte dieser Doppelbestimmung unterschieden sich nicht signifikant voneinander (TC-BC nach der 1.Gelfiltration: 73,1 µg%; TC-BC nach der 2.Gelfiltration: 77,1 µg%; Sättigungsdosis: 400 µg Cortisol pro 100 ml Plasma).

Der Dissoziationsgrad wird weiterhin durch die Sephadex-Menge beeinflusst. Aus Tab.10 geht hervor, daß die Bindungskapazität mit steigender Sephadex-Menge abnimmt. Der infolge der Dissoziation erniedrigte TC-BC-Wert läßt sich korrigieren, wenn man entsprechend einem Vorschlag von HOFFMANN & WESTPHAL (144) auf 0 g Sephadex extra-

poliert. Wir verzichteten angesichts der geringen von uns verwandten Sephadex-Menge (1,7 g Sephadex G-50 M pro Säulenfüllung) auf diesen Schritt.

Tab.10: Transcortin-Bindungskapazität in Abhängigkeit von der Sephadex-Menge
(Sättigungsdosis: 200 µg Cortisol pro 100 ml Plasma)

Sephadex-Menge	TC-BC (µg%)	
	N 1	N 2
19,0 g	20,7	21,4
1,7 g	26,4	27,0
0 g	27,0	27,7

Abk.: N 1+2 = Plasma männlicher Versuchspersonen;
19 g Sephadex G-50 M (Säule K 25/40; Betthöhe 38 cm);
1,7g Sephadex G-50 M (Säule K 9/30; Betthöhe 27 cm);
0 g Sephadex G-50 M (extrapolierter Wert).

Tab.11: Transcortin-Bindungskapazität in Abhängigkeit vom Probevolumen
(Sättigungsdosis: 200 µg Cortisol pro 100 ml Plasma)

Probevolumen	TC-BC (µg%)	
	N 1	N 2
1,0 ml	28,4	25,8
0,5 ml	27,6	25,2
0,3 ml	26,5	24,2

Abk.: N 1+2 = Plasma weiblicher Versuchspersonen.

Tab.12: Transcortin-Bindungskapazität in Abhängigkeit von der Elutionsgeschwindigkeit
(Sättigungsdosis: 200 µg Cortisol pro 100 ml Plasma)

Elutionsgeschwindigkeit	TC-BC (µg%)	
	N 1	N 2
1,0 ml/min	28,6	28,3
0,5 ml/min	26,7	26,8

Abk.: N 1+2 = Plasma männlicher Versuchspersonen.

Die Größe des Probevolumens hatte in dem von uns getesteten Bereich eine zu vernachlässigende Auswirkung auf die Trennschärfe. Nimmt bei konstanter Sephadex-Menge das aufgetragene Volumen ab, verstärkt sich geringgradig die Dissoziation des Protein-Steroid-Komplexes; dementsprechend sinkt die gemessene Bindungskapazität (s.Tab.11; Probevolumen im Standardverfahren: 0,3 ml).

Die Durchflußgeschwindigkeit ist ebenfalls von unwesentlicher Bedeutung für den Dissoziationsgrad des Transcortin-Cortisol-Komplexes, der mit fallender Elutionsrate ansteigt (s.Tab.12; Durchflußgeschwindigkeit im Standardverfahren: 1 ml pro Minute).

In 14 Versuchen mit unterschiedlichem Nachspülvolumen (10 bis 180 ml) ermittelten wir die Puffermenge, die ausreicht, um die nach der Elution des eiweiß-gebundenen Cortisolanteils noch verbleibende, ungebundene Radioaktivität aus dem Gelbett zu waschen. Es zeigte sich, daß 40 ml Phosphatpuffer diesen Zweck erfüllen. Bei den Routinebestimmungen wurde regelmäßig der 40. ml des Nachspülvolumens auf seinen Gehalt an Cortisol-4-C¹⁴ untersucht; er überschritt in keinem Fall den Bereich des Nullwertes.

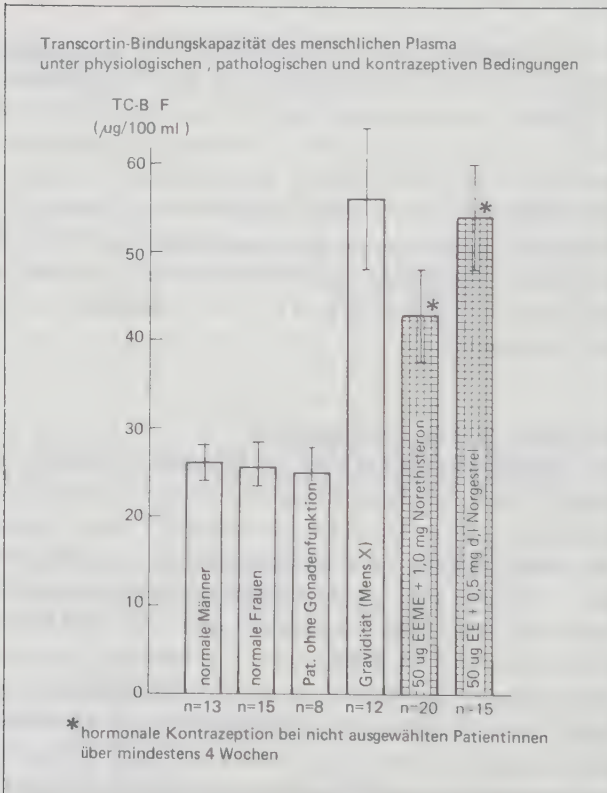
3.5.5. Radioaktivitäts-Bestimmung

Die Radioaktivität aller im Versuch gesammelten Fraktionen wurde mittels Flüssigkeits-Szintillationstechnik gemessen (cpm = Impulse pro Minute). Die Hintergrundstrahlung betrug im Durchschnitt 30 cpm (Nulleffekt). Die Cortisol-4-C¹⁴-Zählausbeute wurde bei sämtlichen Proben mitbestimmt (Quencheffekt); der Mittelwert des eiweißhaltigen Eluatanteils lag bei 71%. Keinerlei Unterschiede ergaben sich bei Vergleichsmessungen mit Glas- bzw. Plastik-Probenfläschchen (2 TC-BC-Doppelbestimmungen; Glas: 29,4 und 29,7 µg%; Plastik: 30,0 und 28,8 µg%). Unter Berücksichtigung von Null- und Quencheffekt ließ sich die Radioaktivität in Zerfällen pro Minute (dpm) ermitteln.

3.5.6. Transcortin-Bindungskapazität unter physiologischen, pathologischen und kontrazeptiven Bedingungen

Abb.5 zeigt die mittels der modifizierten Isotopen-Gelfiltrations-Technik bestimmte Transcortin-Bindungskapazität von gesunden männlichen und weiblichen Versuchspersonen sowie Schwangeren am Ende des dritten Trimesters. Sie betrug $26,1 \pm 2,3 \mu\text{g}\%$ bei Männern im Alter zwischen 24 und 28 Jahren ($n=13$), $25,5 \pm 3,1 \mu\text{g}\%$ bei geschlechtsreifen Frauen vor der Menopause ohne Hormonmedikation ($n=15$) und $56,0 \pm 8,2 \mu\text{g}\%$ bei Patientinnen im zehnten Schwangerschaftsmonat ($n=12$).

Abb.5



Die TC-BC-Werte von unbehandelten Patientinnen ohne Gonadenfunktion, die an der klinischen Vergleichsprüfung der kontrazeptiven Steroide teilnahmen, lagen im Normalbereich ($24,1 \pm 2,7 \mu\text{g}\%$; $n=8$). Dagegen führte die Verabfolgung hormonaler Kontrazeptiva bei nicht ausgewählten Probandinnen über mindestens 4 Wochen zu einem hochsignifikanten Anstieg der Bindungskapazität (t-Test für unabhängige Stichproben: Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,001$), nach ORTHO-NOVUM 1/50 auf $42,8 \pm 5,3 \mu\text{g}\%$ ($n=20$) und nach EUGYNON auf $54,2 \pm 6,4 \mu\text{g}\%$ ($n=15$).

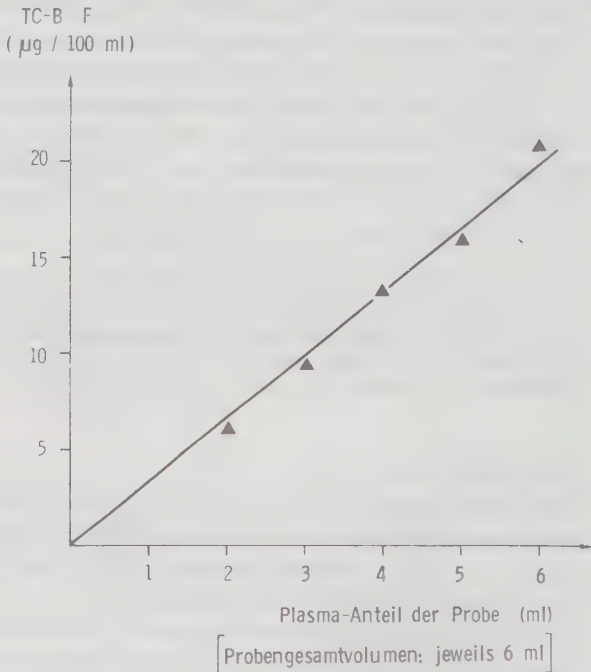
Die relativ hohen Standardabweichungen in einzelnen Gruppen beruhen nicht ausschließlich auf der biologischen Variabilität der Versuchspersonen; sie sind zum Teil methodisch bedingt. Die hier angegebenen Mittelwerte beinhalten nämlich auch die Ergebnisse solcher Bestimmungen, die anfänglich unter Verwendung einer höheren Sättigungsdosis (200 μg Cortisol pro 100 ml Plasma; s. Abschnitt 3.5.3.) durchgeführt wurden.

3.5.7. Empfindlichkeit

Abb.6 demonstriert die relative Sensitivität unserer Methode. Dem Plasma einer männlichen Versuchsperson wurde abgestuft Phosphatpuffer pH 7,4 zugesetzt (1,2,3 bzw. 4 ml pro Ansatz; Endvolumen: jeweils 6 ml). Unter Standardbedingungen ermittelten wir die Bindungskapazität aliquoter Anteile der Verdünnungsreihe (Probenvolumen: je 0,3 ml; 5 Doppelbestimmungen). Die Analyse der unverdünnten Probe ergab einen Wert von $20,8 \mu\text{g}\%$; der kleinste gemessene TC-BC-Wert lag bei $6,3 \mu\text{g}\%$ (Verdünnungsstufe 1:2). Abb.6 zeigt, daß eine gleichsinnige lineare Abhängigkeit der erfaßten Transcortin-gebundenen Cortisolmenge von dem CBG-Gehalt des Untersuchungsmaterials besteht (Regressionsgerade $y = -0,35 + 3,38 x$; Korrelationskoeffizient $r = 0,9992$; Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,001$).

Abb. 6

TRANSCORTIN-BINDUNGSKAPAZITÄT IN ABHÄNGIGKEIT VON
DER VERDÜNNUNG DER PLASMAPROBE MIT PHOSPHATPUFFER



3.5.8. Präzision

Zur Feststellung der methodischen Fehlerbreite des Standardverfahrens wurden Sechsfachbestimmungen aliquoter Portionen identischer Proben (Plasma eines männlichen Probanden bzw. einer Schwangeren im 3. Tri-mester) unter Einhaltung konstanter Versuchsbedingungen durchgeführt. Die in Tab. 13 angegebene intra-assay Streuung ("within-batch variability") resultiert aus der mehrfachen Wiederholung der Analyse in Serie am selben Tag. Die inter-assay Streuung ("between-batch variability") wurde unter Verwendung jeweils neuer

Reagenzien und anderer Sephadex-Säulen an verschiedenen Tagen ermittelt. Darüberhinaus prüften wir, ob die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse von der individuellen Genauigkeit des jeweiligen Untersuchers beeinflusst wird. 89 nicht ausgewählte Doppelbestimmungen aus dem Routineprogramm unseres Labors wurden statistisch ausgewertet. Die Präzision des Standardverfahrens geht aus Tab.13 hervor.

Tab.13: Präzision der modifizierten Gelfiltrations-Methode

- a) TC-BC-Sechsfachbestimmungen derselben Probe durch einen Untersucher

Kenn- werte	intra-assay Variabilität		inter-assay Variabilität	
	N	G	N	G
$\bar{x}$	23,7	45,6	23,8	45,6
s	0,4	0,6	0,6	1,1
V	1,7	1,3	2,5	2,4

Abk.: N = Plasma einer männlichen Versuchsperson;

G = Plasma einer Schwangeren (3.Trimester);

$\bar{x}$ = Mittelwert ($\mu\text{g}\%$); s = Standardabweichung ($\pm\mu\text{g}\%$);

V = Variationskoeffizient (%).

- b) TC-BC-Doppelbestimmungen verschiedener Proben durch zwei Untersucher

TC-BC Bereich ($\mu\text{g}\%$)	Standardabweichung s_d bei Doppelbest.	
	Untersucher A	Untersucher B
20 - 30	$\pm 1,0$ (n=37)	$\pm 0,4$ (n=11)
40 - 60	$\pm 1,2$ (n=30)	$\pm 0,6$ (n=10)

Abk.: s_d = Standardabweichung bei Doppelbest. ($\mu\text{g}\%$);
n = Anzahl der Doppelbestimmungen.

5.6.

DISKUSSION

5.6.1. Die Entwicklung eines zuverlässigen und gleichzeitig nicht aufwendigen Verfahrens zur Messung der Transcortin-Bindungskapazität gehört trotz der Vielzahl an bisher veröffentlichten Bestimmungsprinzipien weiterhin zu den wichtigen Aufgaben der biochemischen und klinischen Forschung (144). Eine allgemein anerkannte Methode der Kapazitätsanalyse stellt die Isotopen-Gelfiltrations-Technik nach DOE et al. (73) dar, die wir durch die Einführung des Adsorptionsschrittes zwecks Entfernung der endogenen und exogenen Steroide unter Verwendung des von HEYNS u.a. (142) beschriebenen Verfahrens verändert haben. Im folgenden wird die Zuverlässigkeit unserer modifizierten Methode anhand der von BORTH (15) angegebenen Kriterien diskutiert.

Die Prüfung der Spezifität ("specificity") eines analytischen Verfahrens beinhaltet die Frage, ob die abschließliche Bestimmung der gesuchten Substanz ohne eine Miterfassung interferierender Verbindungen gewährleistet ist. Das setzt die eindeutige physiko-chemische oder biologische Charakterisierung des Untersuchungsobjektes voraus. Im vorliegenden Fall muß man berücksichtigen, daß nicht die CBG-Konzentration selbst, sondern die Cortisol-Bindungskapazität des Transcortins quantitativ ermittelt werden soll.

Die Differenzierung des im Blut zirkulierenden protein-gebundenen Cortisolanteils in eine spezifisch Transcortin-gebundene und eine unspezifisch Albumin-gebundene Fraktion beruht auf nachstehenden CBG-charakteristischen Merkmalen,

- a) der begrenzten Cortisol-Bindungskapazität und
- b) der höheren Cortisol-Bindungsaffinität, die mit steigender Temperatur abnimmt (73).

Unter Ausnutzung dieser Eigenschaften kann die Transcortin-Bindungskapazität für Cortisol mit Hilfe der

Isotopen-Gelfiltrations-Methode bestimmt werden. Zu den Grundvoraussetzungen, an deren Erfüllung sich der Spezifitätsanspruch des Verfahrens überprüfen läßt, gehören die Postulate,

- a) daß die Bindungskapazität unabhängig von der Sättigungsdosis per definitionem einen gewissen Plateauwert nicht überschreitet und
- b) daß die relativ geringe Cortisol-Affinität von Albumin bei 4°C zu einer vollständigen Dissoziation des Albumin-Cortisol-Komplexes während der Säulenchromatographie führt.

Im Gegensatz zu anderen Autoren (29,30,58,71,73,144,240, 271,313,314) konnten wir die Beobachtungen von BURGER & Mitarbeitern (28) bestätigen, daß auch nach der Gelfiltration eine gewisse Menge Cortisol unspezifisch an Albumin gekoppelt bleibt. Der Anstieg der Bindungskapazität bei zunehmender Cortisol-Sättigung kann mit diesem Effekt erklärt werden. Allerdings ist der miterfaßte Albumin-gebundene Anteil bei der im Standardverfahren benutzten Sättigungsdosis klein und von der Höhe des CBG-Spiegels unabhängig (s. Abschnitt 3.5.3.). Außerdem wird er nicht beeinflußt durch Schwankungen der Plasma-Albuminkonzentration (s. Abschnitt 3.5.4.), wie sie z.B. unter der Einnahme östrogenwirksamer Medikamente beschrieben werden (1,6,24,168,214,277,284). Wir haben es bei den klinischen Vergleichsstudien daher unterlassen, die Cortisol-Residualbindung an Albumin routinemäßig durch eine zusätzliche Gelfiltration nach selektiver CBG-Hitzeinaktivierung bei 60°C zu ermitteln (28,48,52, 502) und dann bei der Berechnung der Transcortin-Bindungskapazität zu subtrahieren. Auf die Verwendung des umfassenderen Begriffs der "Cortisol-Bindungskapazität im menschlichen Plasma" wurde ebenfalls verzichtet, da er den mit Hilfe dieser Methode gewonnenen Informationen letztlich nicht gerecht wird.

Die Isotopen-Gelfiltrations-Technik in ihrer ursprünglichen Form ist mit einem zusätzlichen Nachteil hinsichtlich der Spezifität verbunden, da die Möglichkeit

einer kompetitiven Cortisol-Verdrängung von den CBG-Bindungsstellen durch konkurrierende Steroide in vitro besteht. So resultieren die während der Schwangerschaft erhöhten Progesteron-Spiegel in einer artifiziellen, versuchsbedingten Senkung der TC-BC-Werte (61,67,76,248, 253,255,256,271,313,314). Ähnliche Effekte, ausgelöst z.B. durch die in der hormonalen Kontrazeption gebräuchlichen synthetischen Gestagene, können nicht ausgeschlossen werden. Unsere Modifikation der Methode bringt eine wesentliche Verbesserung mit sich: die Einführung des Adsorptionsschrittes gewährleistet eine vollständige Elimination der im Plasma vorhandenen Steroide vor der Gelfiltration (s. Abschnitt 3.5.2.), verhindert somit eine potentielle Verfälschung der Meßergebnisse und erhöht folglich die Spezifität der Bestimmung.

Andere "stripping"-Verfahren erscheinen weniger bzw. überhaupt nicht geeignet. Die Extraktion mit organischen Lösungsmitteln verursacht eine irreversible Transcortin-Denaturierung (67,77,253,314). Die Äquilibriumdialyse bei 40°C mit einer Rinder-Albumin-Lösung (67) oder Phosphatpuffer (310) vermag eine komplette Entfernung der Steroide nicht herbeizuführen. Die Gelfiltration bei 46°C (73,144,210,311,312,314; eigene Ergebnisse s. Abschnitt 3.5.2.) bzw. einem pH von 5,0 bis 5,5 (281) bewirkt zwar auf Grund der reversibel aufgehobenen Steroidbindung einen ausreichenden "stripping"-Effekt ohne Zerstörung des CBG-Moleküls, aber sie ist mit einem erheblichen Zeitaufwand verbunden. Dagegen zeichnet sich die auf kompetitiver Adsorption beruhende Aktivkohlemethode (118) durch technische Simplizität bei vergleichbarer Effizienz aus; ihre Anwendung resultiert in der praktisch vollständigen Elimination der im Blut vorhandenen Steroide, ohne Einfluß auf die Bindungseigenschaften des Transcortins zu nehmen (60,142; eigene Ergebnisse s. Abschnitt 3.5.2.).

Als Beweis für die Spezifität des von uns benutzten Verfahrens dienen folgende Resultate:

- a) die mittels Gelfiltration abgetrennte Eiweißfraktion normaler Versuchspersonen bindet maximal ca. 25 µg Cortisol pro 100 ml Plasma (s.a. Tab.14); dieser Wert zeigt nur während der Schwangerschaft und unter der Therapie mit östrogenwirksamen Pharmaka einen signifikanten Anstieg; die Bindungskapazität ist unabhängig von der Geschlechtszugehörigkeit und Gonadenfunktion der Probanden und unterliegt keiner Tagesrhythmik;
- b) die Cortisol-Bindung der durch Säulenchromatographie isolierten Proteinfraction erreicht ihr Maximum bei 4°C; sie wird bei 46°C reversibel und bei 60°C irreversibel aufgehoben.

Bezieht man sich bei der Definition des Untersuchungsobjektes auf die spezifisch dem Transcortin zugeschriebenen physiko-chemischen und biologischen Eigenschaften (s. Abschnitt 2), so sprechen diese Ergebnisse eindeutig für eine Identität von CBG und der bei der Gelfiltration abgetrennten Eiweißfraktion.

Im übrigen bestätigt ein Vergleich mit den aus der Literatur bekannten Angaben die Resultate unserer methodischen Experimente. Es bestehen keine Unterschiede hinsichtlich der Transcortin-Bindungskapazität von Serum und heparinisiertem Plasma (58,73,268,313). Über längere Zeit eingefrorene Blutkonserven besitzen infolge teilweiser CBG-Inaktivierung durch Zitrat ein herabgesetztes Bindungsvermögen (210,212,253,314). Die Einfrierdauer selbst bleibt ohne Einfluß auf die Bindungsaktivität (58,179,211,253,280,314). Die Sättigung der Bindungsstellen ist bei einer Dosis von 100 µg Cortisol pro 100 ml Plasma gewährleistet (59,66,73,313); dabei reicht eine Inkubationsdauer von 60 Minuten bei 37°C völlig aus (71,73,210,271).

Unter der Richtigkeit ("accuracy"; Synonym: Exaktheit) einer Analyse versteht man definitionsgemäß den Grad an Exaktheit, mit der die quantitative Bestimmung der tatsächlich in der Probe vorliegenden Konzentration des gesuchten Faktors möglich ist. Sie gilt als Maß für die Größe des systematischen Fehlers einer Methode ("bias"), der mit Hilfe statistischer Auswertungsverfahren nicht erfaßt werden kann. Ihr absoluter Wert läßt sich nur durch Versuche feststellen, bei denen man die maximale Wiederfindung bekannter Mengen der Reinsubstanz ermittelt, die vor der Analyse dem Untersuchungsmaterial zugesetzt werden. Da kein isoliertes Transcortin zur Verfügung stand, konnten wir die absolute Richtigkeit nicht bestimmen. Eine Aussage über den relativen Grad der Exaktheit unserer Resultate läßt sich anhand eines Vergleiches mit den Ergebnissen zuverlässiger Referenzmethoden machen. Tab.14 zeigt, daß die durch die modifizierte Isotopen-Gelfiltrations-Technik ermittelten Werte mit den bisher publizierten Angaben über die Höhe der Transcortin-Bindungskapazität bei normalen Probanden und während der Schwangerschaft gut übereinstimmen (s.a. Abschnitt 3.5.6.).

Im folgenden wird der Versuch einer Abschätzung des systematischen Fehlers, dh. der "Unrichtigkeit" des Verfahrens, unternommen.

Die Nachteile der Trennung von eiweiß-gebundenem und ungebundenem Cortisolanteil durch die Säulenchromatographie mit Sephadex ergeben sich aus der Tatsache, daß während der Gelfiltration kein Äquilibrium zwischen den beiden Komponenten besteht (29,30,255,313,314); vielmehr wird die Trennung in einem sich fortwährend ändernden System vollzogen. Da die Cortisol-Bindung an Transcortin auf nonkovalenten Kräften beruht, unterliegt sie dem Massenwirkungsgesetz (121,144,226,313). Folglich kommt es während der Elution zu einer kontinuierlichen Dissoziation des Protein-Steroid-Komplexes (58,71,113,179, 240). Dieser Dialyse-Effekt kann bei der Durchführung

des "steady-state"-Gelfiltrations-Verfahrens nach BURKE (29,30) verhindert werden; jedoch benötigt man dazu relativ große Mengen an Untersuchungsmaterial (Probevolumina von ca. 25 ml Plasma). Die von HOFFMANN & WESTPHAL (144) eingeführte Extrapolations-Technik gestattet zwar eine Dissoziationsverluste korrigierende Bestimmung der Bindungskapazität, setzt aber die mehrfache Gelfiltration derselben Probe mit unterschiedlichen Sephadex-Mengen voraus (s.a. Abschnitt 3.5.4.). Da sich der Dissoziationsgrad des Transcortin-Cortisol-Komplexes durch adäquate Wahl der Versuchsbedingungen wie Temperatur

Tab.14: Literaturangaben über die Transcortin-Bindungskapazität bei normalen Probanden und in der Schwangerschaft

Untersucher	Methode	TC-BC (µg%)	
		N	G
DAUGHADAY et al. 1962	ED	20 $\pm$ 5	
SANDBERG et al. 1964	ED	30	
WESTPHAL 1967a	ED	26	
MILLS 1962	UF	23	
KEANE et al. 1969	UF	26 $\pm$ 4	53 $\pm$ 16
OSORIO & SCHATS 1964	PE	24 $\pm$ 4	
LEYBOLD et al. 1967	EA	26 $\pm$ 3	42
PEGG & KEANE 1969	CA	23 $\pm$ 3	47 $\pm$ 7
TRAPP & WEST 1969	CA	19 $\pm$ 2	52 $\pm$ 6
PIRKE & STAMM 1972	CA	22	
DE MOOR et al. 1962	GF	26 $\pm$ 4	52
MURPHY & PATTEE 1963	GF	31 $\pm$ 5	
QUINCEY & GRAY 1963	GF	22	
DOE et al. 1964	GF	24 $\pm$ 3	51
LINDNER 1964	GF	18	50
HOFFMANN & WESTPHAL 1969	GF	27	
BURGER et al. 1970	GF	24 $\pm$ 8	
eigene Ergebnisse	GF	26 $\pm$ 3	56 $\pm$ 8

Abk.: N = Plasma normaler Versuchspersonen; G = Plasma von Schwangeren; ED = Äquilibriumdialyse; UF = Ultrafiltration; PE = Papierelektrophorese; EA = enzymatische Bestimmung; CA = Adsorptionsmethode; GF = Gelfiltration.

(59,73,179,253,271,312,313), pII-Wert (67,313), Sephadex-Menge (58,144,313), Säulendimensionen (58,113,253,271,313), Probevolumen (58,179) und Elutionsgeschwindigkeit (58,113,144,179,240,253,313) auf ein Minimum reduzieren läßt, haben wir aus Praktikabilitätsüberlegungen auf die Anwendung der oben zitierten Verfahren verzichtet.

Eine weitere Fehlermöglichkeit birgt der Adsorptionsschritt in sich: Wiederfindungsexperimente mit markiertem Albumin ergaben, daß dieses Eiweiß in geringem Umfang (ca. 5%) von der Aktivkohle adsorbiert wird (s. Abschnitt 3.5.2.). Sollte sich das Adsorbens gegenüber Transcortin ähnlich verhalten, würde der CBG-Spiegel der Probe artifiziell gesenkt und somit die Richtigkeit der Methode beeinträchtigt. Allerdings wird eine Beeinflussung der Transcortin-Konzentration durch die Behandlung mit Norit A von HEYNS et al. (142) verneint. In diesem Zusammenhang muß darauf hingewiesen werden, daß die Einführung des Adsorptionsschrittes den Grad der methodischen Exaktheit grundsätzlich verbessert, da eine versuchsbedingte Abnahme der TC-BC-Werte infolge der potentiellen in-vitro-Verdrängung des Cortisols von den CBG-Bindungsstellen durch andere Steroidhormone ausgeschlossen ist. Ferner erlaubt unsere Modifikation eine direkte Berechnung der Bindungskapazität. Dadurch entfällt die Bestimmung des körpereigenen Cortisol-Spiegels im Blut, die von DE MOOR & Mitarbeitern (58) bzw. DOE u.a. (73) unter Benutzung der unzuverlässigen kolorimetrischen bzw. fluorometrischen Verfahren (69,230) vorgenommen wurde.

Festzuhalten bleibt, daß die mittels der modifizierten Gelfiltrations-Methode gemessene Transcortin-Bindungskapazität auf Grund des Dialyse-Effektes einen submaximalen Wert darstellt (313); möglicherweise werden die Dissoziationsverluste jedoch durch die Miterfassung der Cortisol-Residualbindung an Albumin bei der Kapazitäts-Endbestimmung ausgeglichen. Trotz gewisser Limitationen dieser Technik sind durchaus die Voraussetzungen zur

weiter ehenden Interpretation experimenteller Ergebnisse von klinischen Vergleichsstudien gegeben; Bedingung dafür ist allerdings die strikte Standardisierung des Verfahrens (253,313,314).

Als Kriterium der Empfindlichkeit ("sensitivity") einer Analyse dient die kleinste meßbare und von Null signifikant unterscheidbare Konzentration der zu bestimmenden Verbindung. Sie muß durch Wiederfindungsexperimente mit der Reinsubstanz ermittelt werden. Da kein originäres Transcortin zur Verfügung stand, war eine Festlegung der absoluten Empfindlichkeitsschwelle nicht möglich. Versuche mit einer Plasma-Verdünnungsreihe (s. Abschnitt 3.5.7.) demonstrieren die relativ hohe Sensitivität der von uns benutzten Methode, die klinischen Ansprüchen in ausreichendem Maße gerecht wird.

Die Präzision ("precision"; Synonyma: Genauigkeit, Reproduzierbarkeit) eines Verfahrens läßt sich ablesen am Grad der Übereinstimmung von Einzelwerten, die aus Mehrfachbestimmungen derselben Probe unter unveränderten Bedingungen resultieren. Sie gibt das Ausmaß der methodischen Variabilität und die Größe des zufälligen Fehlers an und kann mit Hilfe statistischer Parameter zahlenmäßig erfaßt werden. Die gute Reproduzierbarkeit unserer Ergebnisse geht aus Tab.13 hervor. Die Streuung der Sechsfachbestimmungen identischen Untersuchungsmaterials in einem Ansatz ("within-batch") wie auch von Ansatz zu Ansatz ("between-batch") ist sehr gering; der Variationskoeffizient als Index des relativen Fehlers der Einzelanalyse liegt jeweils unter 5%; ein Verzicht auf Doppelbestimmungen bei der Routineanwendung der modifizierten Gelfiltrations-Technik ist daher grundsätzlich gestattet (252). Die niedrige Standardabweichung bei 89 nicht ausgewählten Doppelbestimmungen von unterschiedlichen Proben durch zwei verschiedene Untersucher (durchschnittlich $\pm 0,8 \mu\text{g}\%$) deutet ebenfalls auf eine hohe Präzision hin.

3.6.2. Für die objektive Beurteilung der Brauchbarkeit einer analytischen Methode ist neben den vier Zuverlässigkeitskriterien die Praktikabilität von wesentlicher Bedeutung. Unsere Vereinfachung des Gelfiltrations-Verfahrens ermöglicht die direkte Berechnung der Transcortin-Bindungskapazität ausschließlich mittels der beim Sättigungsschritt zugeführten, genau definierten Menge an radioaktiv-markiertem und nicht-markiertem Cortisol. Eine zusätzliche Bestimmung der endogenen Cortisol-Konzentration anhand der kompetitiven Proteinbindungsmethode (211,221) bzw. der noch aufwendigeren kolorimetrischen oder fluorometrischen Techniken (69,230) ist daher nicht erforderlich. Das bedeutet eine erhebliche Steigerung der Praktikabilität. Eine weitere Verkürzung der Versuchsdauer ergibt sich aus Experimenten, mit denen wir in Abweichung von anderen Autoren (58,73,144,313) eindeutig zeigen konnten, daß ein Volumen von 40 ml Phosphatpuffer genügt, um nach der Elution des protein-gebundenen Cortisolanteils die restliche, ungebundene Radioaktivität vollständig aus dem Gelbett zu waschen und die Sephadex-Säule damit erneut verwendungsfähig zu machen (s. Abschnitt 3.5.4.).

Mit Hilfe des modifizierten Gelfiltrations-Verfahrens lassen sich acht Bestimmungen pro Person und Arbeitstag durchführen. Die Methode ist leicht zu erlernen und kaum stör anfällig. Ihre Anwendung setzt ein Laboratorium voraus, in dem der Umgang mit Radioisotopen möglich ist. Der apparative Aufwand (s. Abschnitt 3.3.) kann reduziert werden, wenn man von der für Routineanalysen nicht notwendigen photometrischen Identifikation der Eiweißfraktion absieht.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die von uns ausgearbeitete Modifikation der Isotopen-Gelfiltrationstechnik durch die Einführung des Adsorptionsschrittes zur Entfernung der endogenen und exogenen Steroide aus dem Untersuchungsmaterial

- a) die methodischen Zuverlässigkeitskriterien grundsätzlich erfüllt;
 - b) wesentliche Verbesserungen hinsichtlich der Spezifität, Richtigkeit und Praktikabilität mit sich bringt;
 - c) in ihren Ergebnissen den aus der Literatur bekannten Werten entspricht
- und somit eine nützliche Bereicherung der bereits vorhandenen Methoden zur Bestimmung der Transcortin-Bindungskapazität im menschlichen Plasma darstellt.

4. KLINISCH-EXPERIMENTELLER TEIL

4.1.

VORBEMERKUNGEN

4.1.1. Östrogen-Potenz: Definition

(Synonyma: Östrogen-Aktivität, Östrogen-Wirksamkeit, Östrogenizität) Der Begriff der Östrogen-Potenz kontrazeptiver Steroide hat im Laufe der letzten Jahre erheblich an Bedeutung gewonnen. Ausgangspunkt dieser Entwicklung war die Erkenntnis, daß bei der Beurteilung der Zusammensetzung hormonaler Kontrazeptiva - gerade unter dem Aspekt aufgetretener Nebenwirkungen - nicht die verabfolgte Östrogenmenge, sondern vielmehr die zugeführte biologische Aktivität eine ausschlaggebende Rolle spielt.

Daher müssen als Bestimmungskriterien der Gesamt-Östrogenizität von Kombinationspräparaten gelten (15,70,84, 85,106,116,164,171,183,287)

- A. die biologische Wirksamkeit der Östrogenkomponente in Abhängigkeit von chemischer Struktur und Dosis;
- B. mögliche Östrogen- bzw. Anti-Östrogen-Partialwirkungen der Gestagenkomponente, die bedingt sein können durch
 - a. eine inhärente Östrogen- bzw. Anti-Östrogen-Potenz
 - b. eine metabolische Umwandlung in Östrogene und
 - c. eine Verunreinigung mit Östrogenen; sowie
- C. der Grad der Unterdrückung der Östrogensekretion.

4.1.2. Östrogen-Potenz: Bestimmungsverfahren

Die Vielzahl an zu berücksichtigenden Parametern deutet bereits auf die Problematik hin, mit der sich der Untersucher bei der Wahl einer geeigneten Methode zur Bestimmung der Gesamt-Östrogenizität konfrontiert sieht.

Grundsätzlich erschwerend wirkt sich dabei der Umstand aus, daß die Reaktion der genitalen Erfolgsorgane auf die gleichzeitige Applikation von Östrogenen und Gestagenen letztlich einem im einzelnen nicht zu differenzierenden Summationseffekt dieser Hormone entspricht (2,9,38,54,114,181,192,193,219,298,300).

Bei der Analyse des biologischen Wirkungsspektrums der Einzelkomponenten stehen im Tierexperiment (Mäuse, Ratten) folgende Verfahren zur Verfügung:

A. zur Ermittlung der Östrogen-Aktivität

- a. die Uterus-Wachstums-Teste (91,172,249);
Diesen Methoden bleibt der Vorwurf mangelnder Spezifität nicht erspart, da auch "reine" Gestagene und Androgene eine mäßige Zunahme des Uterusgewichtes hervorrufen (82,84,85,100,218,224).
- b. die Vaginalabstrich-Teste (2,3,10,97,278); sowie
- c. Verfahren, die auf der unterschiedlichen Steroidaffinität zu vaginalen Östrogen-Rezeptoren (134, 190) bzw. der Östrogenabhängigkeit der Mitoserate des Scheidenepithels (191,192), der uterinen und vaginalen RNS-Synthese (109,134,203), der vaginalen Tetrazolium-Reduktion (188,189) und der Sialinsäure-Konzentration im Scheidensekret (220) beruhen.

B. zur Ermittlung der Anti-Östrogen-Aktivität

- a. die Uterus-Wachstums-Teste, deren Grundlage die Hemmung der östrogen-induzierten Zunahme des Uterusgewichtes ist (81,96,98,99,177);
- b. die Vaginalabstrich-Teste, deren Auswertung auf der Unterdrückung der durch Östrogene ausgelösten Verhornung fußt (93,94,97,150).

Die Aussagekraft tierexperimenteller Befunde wird durch den prinzipiellen Vorbehalt hinsichtlich ihrer Übertragbarkeit auf Verhältnisse beim Menschen eingeschränkt (138,149,161,219).

Eine Reihe von Kriterien sind bisher zur Bestimmung der Östrogen-Wirksamkeit kontrazeptiver Steroide auf den menschlichen Organismus herangezogen worden (171):

A. klinische Gesichtspunkte, wie

- a. östrogen-bedingte Partialwirkungen auf die genitalen Erfolgsorgane: qualitative Veränderungen des Vaginalepithels (130,131,148,149,300), des Cervixschleimes (148,149) und des Endometriums (55,127,128,129,148,149,153,250) wie die Auslösung von Entzugsblutungen (131,303);

- b. allgemeine funktionelle und somatische Erscheinungen, die man auf eine Östrogenwirkung zurückführt: die subjektive Besserung von klimakterischen Ausfallerscheinungen (120,130,225), die Auslösung einer Gynäkomastie beim Mann und die Vergrößerung der weiblichen Brust in der Postmenopause (225), die Heilung einer bestehenden Akne (149), die Verminderung der Talgsekretion (291) sowie das Auftreten östrogen-spezifischer Nebenwirkungen unter der Behandlung mit hormonalen Kontrazeptiva (18, 70,78,90,105,106,112,127,128,129,141,146,149,164, 171,199,299).

Auch für diese Assays trifft die Aussage zu, daß sie nur in begrenztem Maße quantifizierbare Rückschlüsse auf die Östrogen-Potenz kontrazeptiver Steroide zulassen (163).

B. biochemische Parameter, wie

- a. die Zunahme der drei klassischen Harnöstrogene (22,25,27,110,153,166,225);

Hier setzt die Kritik primär an der methodischen Unzuverlässigkeit des analytischen Vorgehens an (19,21,84,85,115). In diesem Zusammenhang bleibt festzustellen, daß zur Zeit weder der Metabolismus der kontrazeptiven Steroide in seinen Einzelheiten bekannt noch die Bestimmung sämtlicher endogenen und exogenen Östrogene einschließlich ihrer Abbauprodukte möglich ist.

- b. der Nachweis von Radioaktivität in den phenolischen Urinfraktionen nach Applikation von markierten Gestagenen (116,117,155,173,180);

Die Ergebnisse solcher Stoffwechselstudien liefern zwar Hinweise auf den Metabolismus der einzelnen Hormone, aber sie erlauben keine abschließende Bewertung der biologischen Östrogen-Aktivität dieser Substanzen.

- c. die Erhöhung der Gesamt-Triglyzeride im Serum in Abhängigkeit von der Östrogen-Potenz (288).

Die Entdeckung spezifischer Alterationen der Proteinsynthese in der Leber durch orale Kontrazeptiva (1,6,24, 75,167,168,169,200,214,215,237,238,274,277,284) führte schließlich zur Entwicklung weiterer Verfahren für die Analyse der Östrogen-Wirksamkeit kontrazeptiver Steroide im Humanversuch (6,23,24,75,215,272,274). Dabei erwies sich die Transcortin-Bindungskapazität für Cortisol als einer der wenigen östrogen-spezifischen, progesteron-unabhängigen Parameter, der infolge seiner linearen Dosisabhängigkeit einen quantitativen Vergleich der Östrogen-Aktivität von Hormonpräparaten erlaubt (6,75, 157,174,175,215,253,261,272,274,277). Zudem zeigte sich, daß der CBG-Spiegel im Gegensatz zu anderen Eiweißen durch Krankheiten sowie östrogen-unwirksame Pharmaka praktisch nicht beeinflußt wird; ferner zeichnet sich dieses Indikatorsystem gegenüber z.B. der Ceruloplasmin-Reaktion durch eine bessere Dosis-Wirkungskorrelation aus (6,75,215,274).

4.2.

KLINISCHE AUFGABENSTELLUNG

Viele Arbeiten sind bisher über den Transcortin-Anstieg nach Verabreichung von Östrogenpräparaten publiziert worden, die bei der oralen Empfängnisverhütung keine Anwendung finden (Östradiol: 157,216; Premarin: 215,261, 271; Stilben-Derivate: 58,65,73,75,77,213,215,223,240, 261,268,271,282). Dagegen gibt es in der Literatur nur wenige Untersuchungen zur Frage der Kapazitätsveränderung unter der Behandlung mit hormonalen Kontrazeptiva (65,66,174,175,214,228,274) und ihren Östrogen- (58,174, 175,204,207,214,215,261,271,272) bzw. Gestagen-Komponenten (6,66,67,174,175).

Es ergibt sich für den klinisch-experimentellen Teil dieser Studie folgende Aufgabenstellung:

- a) die systematische in-vivo-Bestimmung der Östrogen-Potenz hormonaler Kontrazeptiva (Einphasenpräparate)

einschließlich ihrer Östrogen- bzw. Gestagen-Komponenten anhand der Beeinflussung der Transcortin-Bindungskapazität.

Damit soll ein Beitrag zur Frage des biologischen Wirkungsspektrums kontrazeptiver Steroide und der Östrogenversorgung des weiblichen Organismus bei der oralen Empfängnisverhütung geleistet werden. Darüberhinaus soll durch

- b) die Prüfung eines lokal applizierten Östrogens (Dien-oestrol) auf seine Systemwirksamkeit mit Hilfe des CBG-Spiegels

ein weiterer Nachweis dafür erbracht werden, daß sich die Transcortin-Bindungskapazität für Cortisol im menschlichen Plasma als spezifische Globalreaktion zur Erfassung systemischer Östrogenwirkungen von Hormonpräparaten eignet.

4.3.

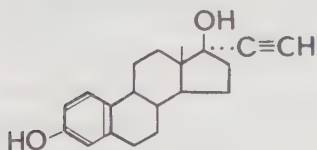
PROBANDINNEN UND THERAPIESCHEMA

Anmerkung: Die Transcortin-Bindungskapazität wurde ausschließlich unter strikter Einhaltung der im Abschnitt 3.4. festgelegten Versuchsbedingungen ermittelt. Die Bestimmung erfolgte immer am Ende der jeweiligen Kontroll- bzw. Einnahmeperioden. Sämtliche angegebenen Ergebnisse stellen Mittelwerte aus je zwei Einzelmessungen derselben Probe dar.

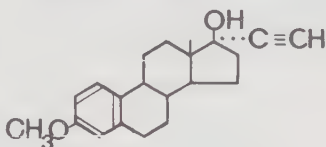
- 4.3.1. Für die klinische Vergleichsprüfung der Östrogenizität von kontrazeptiven Steroiden wählten wir Frauen ohne gonadale Östrogensekretion aus, um die Möglichkeit einer Beeinflussung der Transcortin-Bindungskapazität durch endogene Östrogene auf ein Minimum zu reduzieren (300). Zu diesem Kollektiv zählten acht Patientinnen mit gestörter Sexualentwicklung (Gonadendysgenesie, n=7; testikuläre Feminisierung, n=1) im Alter von 17 bis 32 Jahren. Die Probandinnen dienten zur Herabsetzung der individuellen Streuung als ihre eigenen Kontrollen.

Die Wirkung der beiden in der hormonalen Kontrazeption gebräuchlichen Östrogene (Nomenklatur nach KAPPUS et.al. 1972) wurde auf ihre Abhängigkeit von Struktur und Dosis

untersucht. Bei einer Patientin ermittelten wir den CBG-Spiegel vor und nach der Gabe von täglich 20, 40, 60, 80 und 100 µg Äthinylöstradiol (chemische Bezeichnung: 17 α-Äthiny1-1,3,5(10)-oestratrien-3,17β-diol; Präparatename: PROGYNON C, Schering, Berlin; Einnahmedauer: jeweils 14 Tage pro Dosisstufe).



Äthinylöstradiol



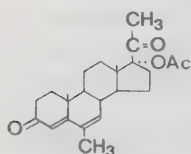
Mestranol

Zwei Versuchspersonen erhielten 50 µg und anschließend 100 µg Äthinylöstradiol pro die über jeweils zwei Wochen; nach einer einmonatigen Behandlungspause folgte die Therapie mit 50 und 100 µg Mestranol (chemische Bezeichnung: 17 α-Äthiny1-3-methoxy-1,3,5(10)-oestratrien-17β-ol) pro die ebenfalls über jeweils 14 Tage. Zwei weiteren Patientinnen verabreichten wir nach demselben Schema zuerst Mestranol und dann Äthinylöstradiol. Beide Östrogene lagen in derselben galenischen Zubereitung vor (Schering, Berlin).

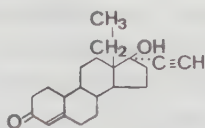
Nachstehende Gestagene (s.Tab.15; Nomenklatur nach JUNKMANN 1968) wurden sukzessiv in der Reihenfolge zunehmender Östrogen-Aktivität^a appliziert (8 Probandinnen): Megestrolazetat 5 mg täglich (6-Methyl-4,6-pregnadien-17 α-ol-3,20-dion-17α-azetat; NIAGESTIN, Novo Industrie, Mainz), d,l-Norgestrel 1 mg täglich (13-d,l-Äthyl-17α-äthiny1-4-gonen-17β-ol-3-on; Schering, Berlin), Norethisteron 10 mg täglich (Synonym: Norethindron; 17α-Äthiny1-4-oestren-17β-ol-3-on; Cilag-Chemie, Alsbach/Bergstraße), Norethisteronazetat 5 mg täglich (Synonym:

^a nach tierexperimentellen Befunden

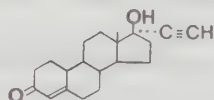
Norethindronazetat; 17 α -Äthinyl-4-oestren-17 β -ol-3-on-17 β -azetat; PRIMOLUT-NOR, Schering, Berlin) und Norethinodrel 10 mg täglich (17 α -Äthinyl-5(10)-oestren-17 β -ol-3-on; Searle, High Wycombe, England). Die Behandlung erstreckte sich jeweils über einen Zeitraum von zwei Wochen; die verabfolgte Gesamtmenge entsprach bei allen Gestagenen annähernd sowohl der Transformationsdosis pro Zyklus (138) wie auch der ovulationshemmenden Minimaldosis (27,136,149,171,185,250).



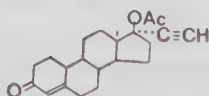
Megestrol-
azetat



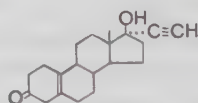
Norgestrel



Norethisteron



Norethisteron-
azetat



Norethinodrel

Direkt im Anschluß an die Gestagen-Vergleichsprüfung wurden aufeinanderfolgend fünf verschiedene Einphasenpräparate (s.Tab.16) eingenommen (4 Probandinnen): ORTHO-NOVUM 1/50 und 2 mg (Cilag-Chemie, Alsbach/Bergstraße), das Versuchspräparat SH 7.1121 und NEOGYNON (Schering, Berlin) sowie ENAVID-E (Searle, High Wycombe, England). Die Therapiedauer betrug jeweils 21 Tage bzw. 20 Tage bei ENAVID-E.

Nach einer Behandlungspause von zwei Wochen verabreichten wir 50 μ g Mestranol (Cilag-Chemie, Alsbach/Bergstraße) pro die über 14 Tage (4 Probandinnen).

Tab.15: Trivialnamen, Transformationsdosis, Östrogen- und Anti-Östrogen-Aktivität der untersuchten Gestagene (nach HANMERSTEIN 1971)

Gestagen (Trivialname)	Trans- formations- dosis (mg/Zyklus)	Östrogen- Aktivität (Tierexp.)	Anti- Östrogen- Aktivität (Tierexp.)
Megestrol- azetat	35 - 50	0	(+)
d-Norgestrel	12	0	+
Norethisteron	100 - 150	+	++
Norethisteron- azetat	50 - 60	+	++
Norethinodrel	150 - 200	++	0

Tab.16: Präparatenamen und Zusammensetzung der untersuchten hormonalen Kontrazeptiva (Einphasenpräparate)

Kontrazeptivum (Präparatename)	Östrogenkomponente (µg pro Tag)	Gestagenkomponente (mg pro Tag)
ORTHO-NOVUM 1/50	Mestranol 50 µg	Norethisteron 1,0 mg
ORTHO-NOVUM 2 mg	Mestranol 100 µg	Norethisteron 2,0 mg
SH 7.1121	Äthinylöstradiol 35 µg	d-Norgestrel 0,25 mg
NEOGYNON	Äthinylöstradiol 50 µg	d-Norgestrel 0,25 mg
EUGYNON	Äthinylöstradiol 50 µg	d,1-Norgestrel 0,5 mg
ENAVID-E	Mestranol 100 µg	Norethinodrel 2,5 mg

4.3.2. In einer Parallelreihe analysierten wir die Beeinflussung des CBG-Spiegels durch hormonale Kontrazeptiva bei nicht ausgewählten gesunden, geschlechtsreifen Frauen. In dieser Gruppe hatten 20 Probandinnen ORTHO-NOVUM 1/50 und weitere 15 Versuchspersonen EUGYNON (Schering, Berlin) über Zeiträume von einem Monat bis zu fünf Jahren eingenommen. Als Kontrollkollektiv dienten 15 Frauen ohne Hormonmedikation.

4.3.3. Schließlich wurde die Transcortin-Bindungskapazität bei vier postmenopausalen Patientinnen untersucht, die an atrophischer Kolpitis erkrankt waren. Die Bestimmung erfolgte jeweils vor und nach 14-tägiger Therapie mit DIENOESTROL-ORTHO, einer Vaginalcreme zur lokalen intravaginalen Östrogenbehandlung (Cilag-Chemie, Alsbach/Bergstraße; täglich 2 x 1 Applikatorfüllung = ca. 1 mg Dienoestrol).

4.4.

KLINISCH-EXPERIMENTELLE ERGEBNISSE

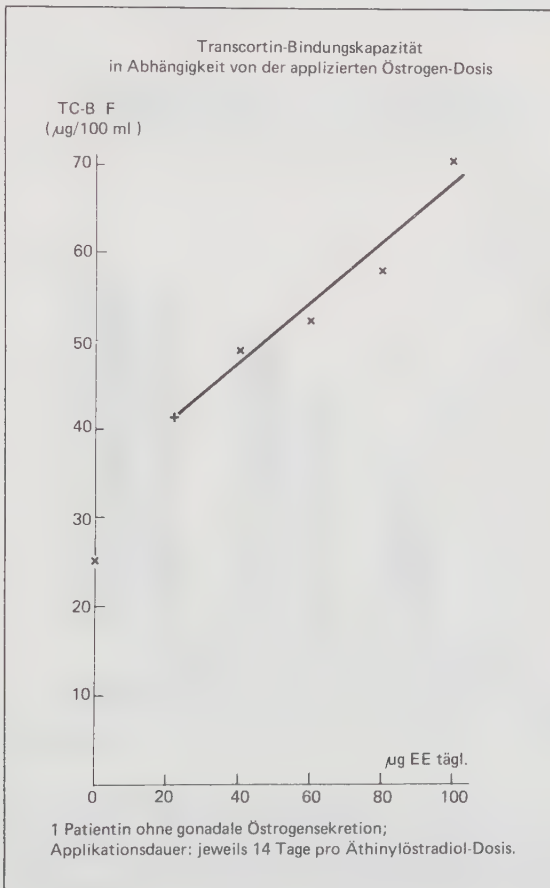
Anmerkung: Die statistische Auswertung der Resultate erfolgte unter Anwendung der allgemein üblichen Testverfahren (33,251,252).

4.4.1. Wirkung kontrazeptiver Östrogene

Die Beeinflussung der Transcortin-Bindungskapazität durch kontrazeptive Östrogene wurde bei Patientinnen ohne Gonadenfunktion untersucht. Abb.7 demonstriert die gleichsinnige lineare Abhängigkeit des CBG-Anstiegs von der applizierten Östrogenosis (Regressionsgerade $y = 33,7 + 0,34 x$; Korrelationskoeffizient $r = 0,9761$; Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,01$). Nach der sukzessiven Einnahme von täglich 20, 40, 60, 80 bzw. 100 µg Äthinyl-östradiol über jeweils zwei Wochen stellten wir eine Erhöhung der Transcortin-Bindungskapazität von 25,3 µg% (Kontrollwert vor Therapiebeginn) auf 40,8; 49,1; 52,3; 57,9 bzw. 70,4 µg% fest (1 Versuchsperson).

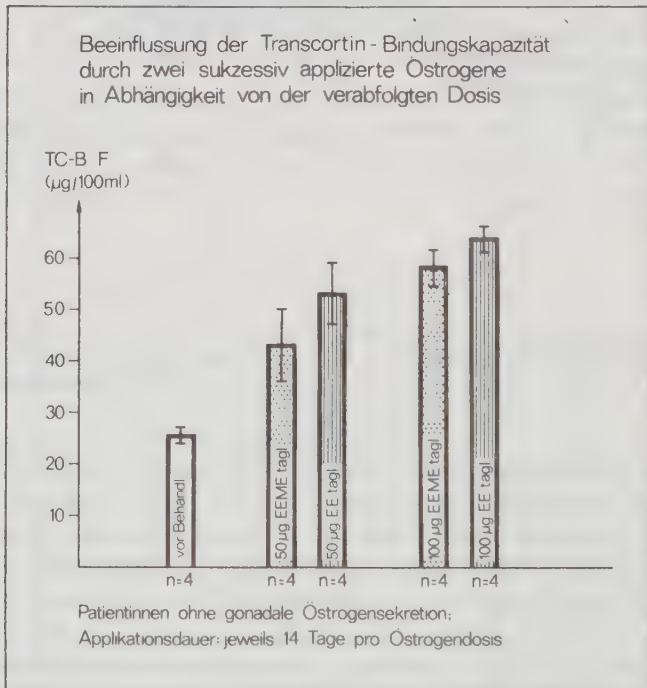
Aus Abb.8 geht hervor, daß bei der Verabreichung von äquivalenten Östrogenmengen in gleicher galenischer Zubereitung Äthinylöstradiol eine signifikant stärkere Zunahme des CBG-Spiegels auslöst als Mestranol (t-Test für verbundene Stichproben: Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$). Während es nach 14-tägiger Gabe von 50 bzw. 100 μg Äthinylöstradiol pro die zu einem TC-BC-Anstieg auf $52,5 \pm 5,9 \mu\text{g}\%$ bzw. $63,8 \pm 2,6 \mu\text{g}\%$ kam, betrug die

Abb.7



Bindungskapazität nach der Behandlung mit Mestranol $42,5 \pm 6,9 \mu\text{g}\%$ bzw. $57,4 \pm 3,6 \mu\text{g}\%$ (4 Versuchspersonen; Kontrollwert vor Therapiebeginn: $25,7 \pm 1,8 \mu\text{g}\%$). Die Reihenfolge der Östrogenapplikation hatte keine Auswirkung auf das Ausmaß der quantitativen Kapazitätsveränderung. Ein vierwöchiges therapiefreies Intervall zwischen dem Wechsel der Östrogenpräparate reichte aus, um den Abfall der Eiweißkonzentration auf Normalwerte zu gewährleisten (TC-BC: $27,1 \pm 1,3 \mu\text{g}\%$).

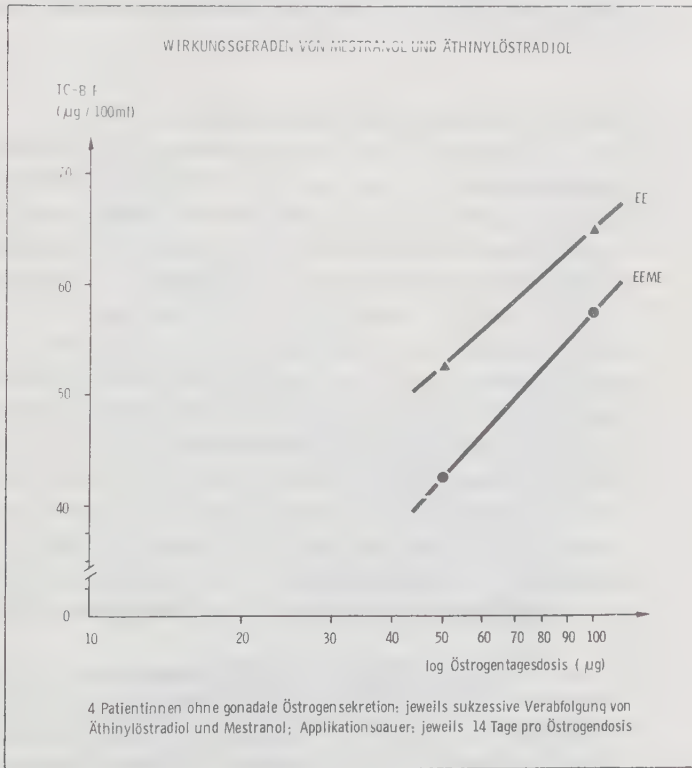
Abb.8



Diese Daten wurden zusätzlich anhand der 4-Punkt-Methode zur biologischen Wertbemessung nach BORTH (14) ausgewertet (s. Abb.9; EE-Regressionsgerade $y = 42,0 + 0,218 x$; EEME-Regressionsgerade $y = 27,6 + 0,298 x$).

Die Bestimmung der relativen Östrogen-Potenz von Mestranol - bezogen auf die quantitative Beeinflussung der Bindungskapazität durch Äthinylöstradiol - ergab mittels Punktschätzung einen Wert von 64%. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% kann man behaupten, daß der wahre Aktivitätsquotient EEME/EE zwischen 0,39 und 0,86 liegt.

Abb. 9



Der relativ breite Vertrauensbereich beruht paradoxerweise auf der Tatsache, daß gleiche Dosen von Äthinylöstradiol und Mestranol den auf Transcortin wirkenden Bestandteil in signifikant unterschiedlichen Konzentrationen enthalten. Zwar läßt sich infolge der mangelhaften Zentrierung unseres Bioassays die bestenfalls

erzielbare Genauigkeit nicht erreichen, aber die Gültigkeit der Ergebnisse bleibt unbeeinträchtigt (33). Abgesehen davon fallen die Präzisionsmaße mit $L = 9$ bzw. $\lambda = 0,1$ sehr befriedigend aus (4,14). Die statistische Analyse dieser Vergleichsstudie zeigt weiterhin, daß der errechnete Aktivitätsquotient nicht von der verabfolgten Menge Mestranol abhängt, d.h. Mestranol enthält keine Substanzen, die mit seinem wirksamen Bestandteil interferieren (33). Die Voraussetzung für die qualitative Gleichartigkeit der beiden Steroide ist somit erfüllt (14). Darüberhinaus bestätigt die Auswertung unserer Resultate, daß die Empfindlichkeit des Transcortin-Indikatorsystems zur biologischen Wertbemessung der untersuchten Östrogene völlig ausreicht (14).

4.4.2. Wirkung kontrazeptiver Gestagene

Abb.10 illustriert die Veränderungen der Transcortin-Bindungskapazität bei acht Patientinnen ohne gonadale Östrogensekretion nach sukzessiver Behandlung mit fünf verschiedenen Gestagenen (Einnahmedauer: jeweils 2 Wochen). Megestrolazetat (5 mg täglich), d,l-Norgestrel (1 mg täglich), Norethisteron (10 mg täglich) und Norethisteronazetat (5 mg täglich) blieben ohne signifikanten Einfluß auf das Cortisol-Bindungsvermögen: Kontrollwert $24,9 \pm 2,9 \mu\text{g}\%$ (n=8); nach Megestrolazetat $24,1 \pm 2,7 \mu\text{g}\%$ (8), d,l-Norgestrel $23,6 \pm 2,2 \mu\text{g}\%$ (7), Norethisteron $24,6 \pm 2,2 \mu\text{g}\%$ (8) und Norethisteronazetat $24,6 \pm 1,8 \mu\text{g}\%$ (8). Dagegen führte die Gabe von Norethinodrel (10 mg täglich^a) zu einem hochsignifikanten Anstieg der Bindungskapazität auf $50,7 \pm 3,1 \mu\text{g}\%$ (t-Test für verbundene Stichproben: Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,001$).

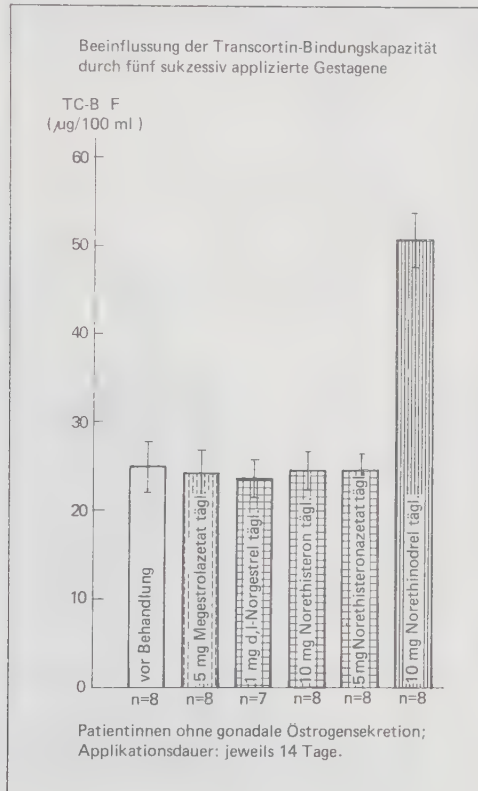
Um den Mestranol-Effekt der verunreinigten Norethinodrel-Tabletten (s.Fußnote b) berücksichtigen zu können, verabfolgten wir im Anschluß an die Therapie mit ENAVID-E nach einer zweiwöchigen Behandlungspause 14 Tage lang $50 \mu\text{g}$ Mestranol (Cilag-Chemie, Alsbach/Bergstraße) pro die (4 Versuchspersonen). Obwohl diese Dosis über dem bekannten Mestranol-Gehalt der applizierten Norethinodrel-

^a Gabe in Form von einer 10-mg-Tabl.: TC-BC $51,3 \mu\text{g}\%$ (n=5);
Gabe in Form von zwei 5-mg-Tabl.: TC-BC $49,5 \mu\text{g}\%$ (n=3).

^b Mestranol-Gehalt der 10-mg-Tabl.: unbekannt;
Mestranol-Gehalt der 5-mg-Tabl.: $19 \mu\text{g}$ EEME pro Tabl. (275).

Tabletten lag, kam es zu einer wesentlich geringeren Kapazitätzunahme (TC-BC: $34,4 \pm 1,4 \mu\text{g}\%$). Der im Verhältnis dazu stärkere CBG-Anstieg, der bei der Östrogenvergleichsstudie nach der Einnahme von täglich $50 \mu\text{g}$ Mestranol (Schering, Berlin) beobachtet wurde (TC-BC: $42,5 \pm 6,9 \mu\text{g}\%$; $n=4$), ist möglicherweise auf die unterschiedliche Galenik der applizierten Substanzen zurückzuführen.

Abb. 10

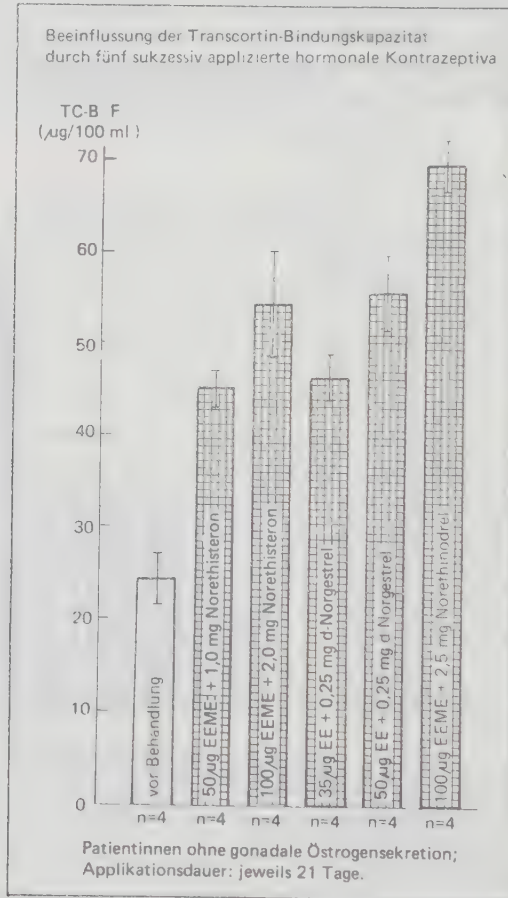


4.4.3. Wirkung hormonaler Kontrazeptiva (Einphasenpräparate)

Die sukzessive Verabreichung von fünf verschiedenen hormonalen Kontrazeptiva bei Patientinnen ohne Keimdrüsenfunktion ($n=4$) führte in allen Fällen zu einem erheblichen CBG-Anstieg (s. Abb. 11). Dabei erwies sich

das Ausmaß der Zunahme als signifikant unterschiedlich und zwar in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Präparate (s.252: Rangvarianzanalyse nach FRIEDMAN: Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$). So betrug die TC-

Abb.11



Bindungskapazität nach dreiwöchiger Einnahme von ORTHO-NOVUM 1/50 $45,0 \pm 2,1 \mu\text{g}\%$, nach ORTHO-NOVUM 2 mg $54,1 \pm 5,8 \mu\text{g}\%$, nach SH 7.1121 $46,2 \pm 2,7 \mu\text{g}\%$, nach NEOGYNON $55,5 \pm 4,3 \mu\text{g}\%$ und nach ENAVID-E $69,2 \pm 2,9 \mu\text{g}\%$.

Die CBG-Bestimmung 14 Tage nach Absetzung von ENAVID-E ergab, daß dieser Zeitraum nicht ausreicht, um das Absinken des Transcortin-Spiegels auf Normalwerte zu ermöglichen (TC-BC: $30,2 \pm 1,7 \mu\text{g}\%$).

Der gleiche Effekt - auch hinsichtlich seines quantitativen Umfanges - ließ sich bei nicht ausgewählten gesunden, geschlechtsreifen Frauen demonstrieren, die Kombinationspräparate über mindestens einen Therapiezyklus eingenommen hatten (s.a.Abb.5). Die Applikation von ORTHO-NOVUM 1/50 bewirkte eine TC-BC-Erhöhung auf $42,8 \pm 5,3 \mu\text{g}\%$ ($n=20$), die Gabe von EUGYNON resultierte in einem signifikant größeren Kapazitätsanstieg auf $54,2 \pm 6,4 \mu\text{g}\%$ ($n=15$; t-Test für unabhängige Stichproben: Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,001$). Der Wert eines unbehandelten Normalkollektivs lag bei $25,5 \pm 3,1 \mu\text{g}\%$ ($n=15$).

4.4.4. Wirkung eines lokal applizierten Östrogens (Dienoestrol)

Tab.17 zeigt, daß die intravaginale Verabfolgung von ca. 1 mg DIENOESTROL-ORTHO täglich über zwei Wochen bei vier postmenopausalen Kolpitis-Patientinnen zu keiner signifikanten Veränderung der Transcortin-Bindungskapazität führt. Vor Therapiebeginn betrug sie $21,3 \pm 1,0 \mu\text{g}\%$, nach Beendigung der Behandlung $22,1 \pm 0,6 \mu\text{g}\%$.

Tab.17: Beeinflussung der Transcortin-Bindungskapazität durch DIENOESTROL-ORTHO (Vaginalcreme)

Patientin	TC-BC ($\mu\text{g}\%$)	
	vor Applikation	nach Applikation
U.G.	20,1	23,0
E.I.	21,8	21,8
G.S.	20,9	22,0
E.W.	22,4	21,5

4.5.

DISKUSSION

Im Vordergrund der Diskussion über die optimale qualitative und quantitative Zusammensetzung hormonaler Kontrazeptiva steht zur Zeit die Frage nach der Östrogenversorgung des weiblichen Organismus unter der Behandlung mit Kombinationspräparaten. Dabei kommt der differenzierten Analyse der Östrogen-Potenz kontrazeptiver Steroide in Abhängigkeit von chemischer Struktur und verabfolgter Dosis eine entscheidende Bedeutung zu.

4.5.1. Die exakte in-vivo-Bestimmung der systemischen Östrogenwirksamkeit dieser Substanzen im Humanversuch setzt eine Methode voraus, die den Anforderungen hinsichtlich Spezifität, Empfindlichkeit und Richtigkeit genügt. Die Transcortin-Bindungskapazität für Cortisol im menschlichen Plasma stellt eines der wenigen Kriterien dar, das diese Ansprüche erfüllt:

- a) Ein Anstieg ist nur während der Schwangerschaft (12, 32, 48, 51, 58, 65, 66, 73, 77, 159, 174, 175, 178, 179, 205, 207, 209, 215, 223, 228, 248, 253, 254, 255, 256, 261, 271, 272, 273, 274, 280, 297, 302, 313, 314; eigene Ergebnisse s. Abschnitt 3.5.6.), nach der Verabfolgung von Östrogenen (48, 50, 51, 52, 58, 65, 73, 74, 75, 76, 77, 157, 174, 175, 204, 205, 207, 209, 212, 213, 214, 215, 216, 223, 254, 240, 256, 258, 261, 262, 268, 271, 272, 280, 282, 297; eigene Ergebnisse s. Abschnitt 4.4.1.), nach der Gabe von Gestagenen, die im Tierexperiment östrogenwirksam sind (6, 66, 174, 175; eigene Ergebnisse s. Abschnitt 4.4.2.), und nach der Therapie mit östrogenhaltigen Kontrazeptiva (65, 66, 174, 175, 214, 228, 274; eigene Ergebnisse s. Abschnitt 4.4.3.) zu verzeichnen. Die intravaginale Applikation eines lokal wirksamen Östrogens (Dienoestrol) führt nicht zu Veränderungen des CBG-Spiegels (s. Abschnitt 4.4.4.). Ebenso bleibt die Einnahme von originärem Progesteron (174, 175) und synthetischen Gestagenen, die im Tierversuch keine Östrogen-Aktivität zeigen (6, 66, 67; eigene Ergebnisse s. Abschnitt 4.4.2.), ohne Einfluß auf die Bindungskapazität.

- b) Dieser östrogen-spezifische Anstieg der Transcortin-Bindungskapazität ist in starkem Maße dosisabhängig (75,157,174,175,215,253,261,272; eigene Ergebnisse s. Abschnitt 4.4.1.). Allerdings läßt sich die Erhöhung der CBG-Konzentration nur nach Verabreichung pharmakologischer, eine bestimmte Transcortin-Reaktionsschwelle übersteigender, substanzcharakteristischer Steroidmengen auslösen (75,213,215,261). Physiologische Schwankungen der Östrogensekretion während des Menstruationszyklus können nicht erfaßt werden (32, 213). Auch unterschreitet die Bindungskapazität mit Ausnahme weniger Krankheitsbilder (s. Abschnitt 2.3.) einen gewissen Minimalwert nicht. So bedingen Östrogenspiegel, die im Vergleich zu gesunden, geschlechtsreifen Frauen erniedrigt sind (Männer: 32,58,61,65, 73,212,223, eigene Ergebnisse s. Abschnitt 3.5.6.; Postmenopause: 58,60,66, eigene Ergebnisse s. Abschnitt 4.4.4.; Gonadendysgenese: 66,73, eigene Ergebnisse s. Abschnitt 3.5.6.), keine signifikante Senkung des CBG-Gehaltes.
- c) Der methodisch bedingten Einschränkung der Richtigkeit experimenteller Daten (s. Abschnitt 3.6.1.: Dissoziationsverluste bei der Gelfiltration, Miterfassung der Cortisol-Residualbindung an Albumin) kommt bei der Auswertung klinischer Vergleichsstudien keine Bedeutung zu, solange die strenge Einhaltung konstanter Versuchsbedingungen gewährleistet ist (253,313,314).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß sich die Transcortin-Bindungskapazität für Cortisol im menschlichen Plasma als spezifische Globalreaktion zur quantitativen in-vivo-Ermittlung der systemischen Östrogen-Wirksamkeit von Hormonpräparaten eignet. Allerdings ist bei der Interpretation der Ergebnisse in Betracht zu ziehen, daß der CBG-Spiegel nur einen von vielen östrogen-abhängigen Parametern darstellt; die Reaktion dieses biologischen Indikatorsystems muß nicht unbedingt mit der Östrogen-Wirkung auf die genitalen und andere extragenitale

Erfolgsorgane identisch sein. Mithin bedeutet die Anwendung dieser Methode nicht die Ablösung, sondern eine hilfreiche Ergänzung anderer Verfahren zur Bestimmung der Östrogen-Potenz.

Bei der Festlegung des Prüfungsmodus muß berücksichtigt werden, daß die Bindungskapazität frühestens nach 14-tägiger Gabe Östrogenwirksamer Substanzen ihr Maximum erreicht (58,75,215,271). Wir haben die Festpräparate jeweils zwei bzw. drei Wochen einnehmen lassen, weil

- a) die Ausdehnung der Behandlungsdauer bis auf ein Jahr keine weitere Erhöhung der CBG-Konzentration nachsichzieht (73,215,271) und
- b) die Transcortin-Reaktion auf Östrogenstimulation bei Einhaltung der Zwei-Wochen-Frist allein von der applizierten Tagesdosis, nicht aber von der verabfolgten Gesamtmenge pro untersuchtem Zeitabschnitt abhängt (215).

Eigene Zeitstudien bestätigten im Gegensatz zu SANDBERG et al. (261) die Angaben anderer Autoren (66,75,214). daß ein 14-tägiges therapiefreies Intervall nach Absetzen der Hormonmedikation nicht ausreicht, um den Abfall des CBG-Spiegels auf Normalwerte zu ermöglichen (s. Abschnitt 4.4.3.). So lag die Bindungskapazität zwei Wochen nach Beendigung der Behandlung mit ENAVID-E noch 30% über dem Ausgangswert. Da aber

- a) das Bindungsvermögen auch unter diesen Voraussetzungen bei der anschließenden Gabe östrogenwirksamer Pharmaka weiter ansteigt (214; eigene Ergebnisse s. Abschnitt 4.4.3.) und
 - b) bei der Erstellung der Dosis-Wirkungskurve mit Äthynylöstradiol wie bei der sukzessiven Prüfung der Gestagene die Substanzen in der Reihenfolge zunehmender Östrogen-Aktivität verabreicht wurden,
- haben wir auf die Einschlebung einer einmonatigen Einnahmepause verzichtet. Obwohl bei der Verabfolgung der Einphasenpräparate in Serie teilweise von diesem Applikationsschema abgewichen wurde, stellte sich nachträg-

lich im Vergleich mit den ausschließlich ein einziges Kontrazeptivum einnehmenden Patientinnen heraus, daß - unabhängig vom Initialwert - eine dreiwöchige Therapie zur Einstellung der Transcortin-Endkonzentration offensichtlich genügt (s. Abschnitt 4.4.3.). So betrug die Bindungskapazität nach Einnahme von ORTHO-NOVUM 1/50 und NEOGYNON bzw. EUGYNON bei der Serienprüfung 45,0 bzw. 55,5 µg% und bei der Einzeltestung 42,8 bzw. 54,2 µg%. "Echte" Kontrollbestimmungen nahmen wir grundsätzlich nur nach einmonatiger Behandlungskarenz vor.

- 4.5.2. Im folgenden Abschnitt soll das biologische Wirkungsspektrum der kontrazeptiven Steroide, die in der BRD gebräuchlich sind, unter besonderer Berücksichtigung der eigenen Ergebnisse erörtert werden.

In Übereinstimmung mit MUSA et al. (215) und SEAL & DOE (272) stellten wir bei der Analyse des Einflusses von kontrazeptiven Östrogenen auf die Transcortin-Bindungskapazität fest, daß nach Überschreitung der CBG-Reaktionsschwelle eine lineare Abhängigkeit des Transcortin-Anstiegs von der applizierten Menge Äthinylöstradiol besteht. Allerdings nimmt die von uns ermittelte Dosis-Wirkungskurve einen steileren Verlauf. Diese Diskrepanz läßt sich durch die unterschiedliche Dauer der Östrogenbehandlung erklären (MUSA u.a., SEAL & DOE: je 6 Tage pro Dosisstufe; eigene Experimente: je 14 Tage). Da die Kapazitätzunahme nach einer Woche nur 67% des möglichen Maximums beträgt (215), liegen die von diesen Autoren publizierten Werte verständlicherweise niedriger. Unsere Untersuchung an einer Probandin beschränkte sich auf den für die Kontrazeption wichtigen Dosisbereich von 20 bis 100 µg Äthinylöstradiol pro die. Mithin ist eine Aussage über die von MUSA & Mitarbeitern angegebene maximale Wirkdosis (300 µg EE täglich) und mittlere wirksame Dosis (87 µg EE täglich) nicht möglich. Bestätigen können wir die Mitteilung, daß bereits 20 µg Äthinylöstradiol

pro die genügen, um einen signifikanten CBG-Anstieg auszulösen. Daraus wird die hohe Empfindlichkeit des Transcortin-Systems als Indikator der Östrogen-Potenz ersichtlich.

Es gibt bisher wenige Vergleichsprüfungen von Äthinyl-östradiol und Mestranol zur Frage der Östrogen-Aktivität dieser Substanzen im Humanversuch trotz ihrer weltweiten Verbreitung als Bestandteil sämtlicher Einphasenpräparate. Unsere Experimente zeigten, daß bei der Verabfolgung äquivalenter Mengen (50 bzw. 100 µg täglich) in gleicher galenischer Zubereitung Mestranol nur 64% der Wirksamkeit von Äthinylöstradiol besitzt - gemessen an der divergenten Zunahme der Bindungskapazität. Der Vergleich anderer Partialwirkungen auf den weiblichen Organismus, wie der anti-gonadotropen Aktivität (119), der Beeinflussung des Vaginalepithelaufbaus (300), der Veränderung des Serum-Triglyzeridspiegels (288) und der Förderung thromboembolischer Prozesse (146), erbrachte keine signifikanten Differenzen hinsichtlich der Östrogenizität. Andererseits deckt sich unsere Feststellung mit tierexperimentellen Befunden (80, 134, 151, 217, 219, 266, 286, 296) und histiometrischen Studien am menschlichen Endometrium (55). Sie korreliert mit der unterschiedlichen anti-ovulatorischen Potenz beider Substanzen im Humanversuch (90, 125, 126, 132, 136, 140, 147, 154, 171, 194, 195, 199, 250, 318) und sie stützt die These, daß Äthinylöstradiol wirksamer ist als sein 3-Methyläther (18, 78, 88, 112, 138, 141, 183, 287, 299). Die Ursachen des Aktivitätsunterschiedes sind zur Zeit noch ungeklärt. Die dazu erforderlichen eingehenden pharmakokinetischen Vergleichsuntersuchungen dieser beiden Steroide bezüglich der Resorption, Proteinbindung und Verstoffwechslung liegen noch nicht vor. Ein Ansatz für die Interpretation ist mit der Beobachtung gegeben, daß Mestranol erst nach der Demethylierung seine östrogenen Eigenschaften entfalten kann (156). Das bedeutet zB. unter dem Aspekt der differenten Molekulargewichte

(EE = 296,4; EEME = 310,4): nach oraler Applikation von Mestranol gelangen selbst bei gleich guter Resorption 5% weniger potentiell östrogenwirksame Moleküle in den Organismus als nach der Gabe einer identischen Dosis Äthinylöstradiol.

Die in der hormonalen Kontrazeption gebräuchlichen Gestagene lassen sich auf Grund ihrer chemischen Struktur und biologischen Wirkungsspektren in zwei Stoffgruppen einteilen (6,15,70,106,122,127,138,164,224,287,299; s.a.Tab.15):

- a) die 17 α -Hydroxy-Progesteron-Derivate, denen man östrogene und androgene Eigenschaften abspricht und die zum Teil anti-östrogene und anti-androgene Wirksamkeit im Tierexperiment entfalten; diese "reinen" Gestagene sind in unserer Studie durch Megestrolazetat vertreten;
- b) die 17 α -Alkyl-19-nor-Androstan-Derivate, deren Aktivitätsspektrum zum einen östrogene und/oder androgene, zum anderen auch anti-östrogene Partialwirkungen umfaßt. Von den Nortestosteron-Abkömmlingen prüften wir Norgestrel, Norethisteron und sein Azetat sowie Norethinodrel auf ihre Beeinflussung der Transcortin-Bindungskapazität.

Die dabei jeweils verabfolgte Gestagen-Gesamtmenge entsprach bei allen Substanzen annähernd sowohl der Transformationsdosis pro Zyklus (138) wie auch der ovulationshemmenden Minimaldosis (27,136,149,171,185,250).

Megestrolazetat, das nach der Zurücknahme von Medroxyprogesteronazetat und Chlormadinonazetat als einziges Acetoxy-Progesteron-Derivat bei der hormonalen Kontrazeption heute noch uneingeschränkt in der BRD Verwendung findet, führte zu keiner Veränderung des CBG-Spiegels (s. Abschnitt 4.4.2.). Dies kann als Beweis fehlender Östrogen-Potenz gewertet werden und bekräftigt tierexperimentelle Ergebnisse (53,85,100,296). Bei gleichzeitig vorhandener Anti-Östrogen-Aktivität (53,85,100,108,

177,198,296) fällt es schwer zu erklären, worauf das relativ erhöhte Thromboembolierisiko nach der Einnahme von Kombinationspräparaten beruht, die Megestrolazetat enthalten (88,146).

Norgestrel, das sich durch eine Äthylgruppe an C¹³ von den anderen Gestagenen der 19-nor-Reihe unterscheidet, besitzt im Tierversuch neben androgenen (138) auch anti-östrogene (95,101,102,104,107,193), jedoch keine östrogenen Eigenschaften (102,107). Die ursprüngliche These, daß diese Substanz im menschlichen Organismus teilweise zu Östrogenen verstoffwechselt wird (116), konnte später nicht aufrechterhalten werden (117,180). Auch im Transcortin-Indikatorsystem fehlen Anzeichen einer Östrogen-Aktivität (s. Abschnitt 4.4.2.). Die beim indirekten Vergleich von d-Norgestrel und d,l-Norgestrel durch Bestimmung des CBG-Spiegels nach Einnahme von NEOGYNON bzw. EUGYNON gewonnenen Ergebnissen stehen nicht im Widerspruch zu der Feststellung, daß allein das d-Stereoisomer dieses Gestagens biologisch wirksam ist (95,100, 103).

Während an der androgenen (84,289,290,292,294) und anti-östrogenen Potenz (81,82,84,85,92,94,95,99,100,102,104, 150,162,196,295,296) von Norethisteron und seinem Azetat keine Zweifel bestehen, finden sich in der Literatur erheblich divergierende Angaben über die Östrogenizität, die nur zum Teil mit dem unterschiedlichen Mestranol-Verunreinigungsgrad der Testsubstanzen zu erklären sind (85,89,162,185,197,224,225,233,295). Keine Östrogen-Aktivität entfalten beide Nortestosteron-Abkömmlinge bei klinischen Versuchen am Menschen (23,83,84,85,131,148, 149,250,289,290,292,294). Die Vaginalabstrich-Teste im Tierversuch ergeben teils negative (82,83,84,85), teils schwach positive Resultate (100,150,151,162,295,296). Im Sinne eines Östrogen-Effektes sind die Erhöhung der Mitoserate des Vaginalepithels (191,192) bzw. die erniedrigte Sialinsäure-Konzentration im Scheidensekret von Mäusen (220) zu deuten. Auch im Uterus-Wachstums-Test

erweist sich Norethisteron als östrogenwirksam (82,84, 85,92,162,232,233); allerdings bleibt diesem Verfahren der Vorwurf mangelnder Spezifität nicht erspart, weil "reine" Gestagene und Androgene ebenfalls eine mäßige Zunahme des Gebärmuttergewichtes bei Mäusen und Ratten hervorrufen (82,84,85,100,218,224). Die von mehreren Autoren geäußerte Vermutung, daß Norethisteron und sein Azetat in vivo teilweise zu Östrogenen abgebaut werden (20,22,25,26,27,110,116,153,166,182,224,225), erscheint bei kritischer Betrachtung gleichfalls nicht haltbar, da sich diese Annahme auf Harnuntersuchungen stützt, deren methodische Zuverlässigkeit zweifelhaft ist (19, 21,84,85,115). Unterstrichen werden solche Bedenken durch Stoffwechselstudien, die unter Benutzung anderer Verfahren keine Hinweise für die Existenz von Östrogenmetaboliten erbrachten (117,155). Unsere Ergebnisse sprechen auch gegen das Vorhandensein östrogenen Eigenschaften: die Transcortin-Bindungskapazität blieb nach der Behandlung mit täglich 10 mg Norethisteron bzw. 5 mg Norethisteronazetat unverändert (s. Abschnitt 4.4.2.). Im Gegensatz dazu stellten BARBOSA & Mitarbeiter (6) einen signifikanten Anstieg des CBG-Spiegels nach der Verabreichung einer dreifach höheren Dosis fest. Die unterschiedliche Wahl der applizierten Steroidmenge mag diese Diskrepanz erklären; möglicherweise genügen 30 mg Norethisteron bzw. 15 mg Norethisteronazetat pro die, um die Transcortin-Reaktionsschwelle zu überschreiten.

Bei der Vergleichsprüfung der Gestagene führte ausschließlich die Einnahme von Norethinodrel zu einem signifikanten Anstieg der CBG-Konzentration (s. Abschn. 4.4.2.). Dieses Steroid, das ursprünglich von ROCK, PINCUS & GARCIA (244) bei der kontrazeptiven Einphasentherapie verwandt wurde, besitzt abweichend von den anderen 19-nor-Androstan-Derivaten eine Doppelbindung zwischen C⁵ und C¹⁰ anstelle von C⁴ und C⁶. Unser Ergebnis bestätigt die Beobachtung von LAYNE et al. (174, 175), die eine Zunahme der eiweiß-gebundenen Cortisolfraktion nach Gabe von Norethinodrel feststellten.

Dieser Effekt kann nicht allein auf der Östrogenkontamination der Testsubstanz beruhen (z.T. 38 µg EEME pro 10 mg Norethinodrel), da die isolierte Applikation von 50 µg Mestranol täglich in einer wesentlich schwächeren Kapazitätserhöhung resultierte; er läßt vielmehr auf eine inhärente Östrogen-Potenz von Norethinodrel schließen. Unser Resultat geht konform mit der in Tierexperimenten (82,83,84,85,89,92,100,150,151,220,232,233,264,265,295,296) und im Humanversuch (83,84,85,148,149,173,224,225,292) gewonnenen Erkenntnis, daß Norethinodrel bei fehlender Anti-Östrogen-Aktivität (82,85,92,99,100,295,296) selbst ein starkes Östrogen darstellt. Angesichts dieser Tatsache ist es schwer verständlich, daß die Einnahme des norethinodrel-haltigen Kontrazeptivums ENAVID-E, das in der BRD nicht erhältlich, aber in den USA und Großbritannien verbreitet ist, mit einem relativ niedrigen Thromboembolierisiko einhergeht (88,146).

Bezieht man die unterschiedlichen biologischen Wirkungsspektren als Kriterium bei der Klassifizierung synthetischer Gestagene stärker mit ein, so bietet sich neben der primär an chemischen Strukturmerkmalen orientierten Einteilung in 17 α -Hydroxy-Progesteron-Derivate und 17 α -Alkyl-19-nor-Androstan-Abkömmlinge eine weitere pointierte Differenzierung (100,219) zwischen "reinen" Gestagenen ohne östrogene und androgene Eigenschaften (z.B. Megestrolazetat), Androgenen mit gestagener Wirksamkeit (z.B. Norgestrel, Norethisteron, Norethisteronazetat) und Östrogenen mit gestagener Aktivität (z.B. Norethinodrel) an.

Die quantitativ vergleichende Analyse der mit Hilfe der Transcortin-Reaktion ermittelten Gesamt-Östrogenizität verschiedener Einphasenpräparate (s. Abschnitt 4.4.3.) erhärtet die Vermutung, daß die Östrogen-Potenz dieser Medikamente als Resultante mehrerer Faktoren aufgefaßt werden muß. (15,70,84,85,105,106,116,164,171,183,287).

Dazu zählen

a) die chemische Struktur der Östrogenkomponente;

So ergibt ein Vergleich der CBG-Spiegel nach der Einnahme von Kontrazeptiva, die sich aus einem östrogen-unwirksamen Gestagen in Kombination mit Mestranol bzw. Äthinylöstradiol zusammensetzen, daß die Transcortin-Synthese durch das mestranol-haltige Präparat (ORTHO-NOVUM 1/50) signifikant geringer stimuliert wird als durch das äthinylöstradiol-haltige Mittel (NEOGYNON; t-Test für verbundene Stichproben: Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$), obwohl die Östrogendosierung bei beiden Medikamenten identisch ist (50 µg täglich). Senkt man die Menge an täglich verabreichtem Äthinylöstradiol um 30% auf 35 µg (Versuchspräparat SH 7.1121), so fällt die Bindungskapazität auf Werte, die der Gesamt-Östrogenizität des Einphasenpräparates mit 50 µg Mestranol (ORTHO-NOVUM 1/50) entsprechen. Damit wird die unterschiedliche Wirkungsstärke der beiden Östrogene demonstriert.

b) die applizierte Östrogenmenge;

So führt die Gabe von Pharmaka, die neben östrogen-inaktiven Gestagenen Östrogene in niedriger Dosierung enthalten (ORTHO-NOVUM 1/50 mit 50 µg EEME bzw. SH 7.1121 mit 35 µg EE), zu einer CBG-Konzentration, die signifikant unter den Werten liegt, die nach der Verabfolgung von Kontrazeptiva mit größeren Östrogenmengen beobachtet werden (ORTHO-NOVUM 2 mg mit 100 µg EEME bzw. NEOGYNON mit 50 µg EE; t-Test für verbundene Stichproben: Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$).

c) die chemische Struktur der Gestagenkomponente.

So kommt es nach der Applikation eines norethinodrel-haltigen Präparates (ENAVID-E) zu einer signifikant stärkeren Kapazitätzunahme als nach der Gabe eines norethisteron-haltigen Medikamentes (ORTHO-NOVUM 2 mg; t-Test für verbundene Stichproben: Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$), obwohl der Östrogenanteil beider Mittel gleich hoch ist (100 µg EEME). Der zusätzliche

Anstieg dürfte mit der Östrogen-Partialwirkung von Norethinodrel zusammenhängen.

Das Ausmaß der Unterdrückung der Östrogeneigenproduktion kann bei der Beurteilung der Gesamt-Östrogenizität von hormonalen Kontrazeptiva offensichtlich vernachlässigt werden. So zeigt ein Vergleich der TC-BC-Werte bei Patientinnen ohne gonadale Östrogensekretion mit den Ergebnissen bei gesunden, geschlechtsreifen Probandinnen nach Einnahme desselben Präparates (ORTHO-NOVUM 1/50), daß der Grad der Einschränkung der Gonadenfunktion ohne signifikanten Einfluß auf die CBG-Reaktion bleibt.

Unsere Resultate bezüglich der unterschiedlichen Gesamt-Östrogenizität der analysierten Einphasenpräparate lassen sich gut vereinbaren mit Befunden, die im Uterus-Wachstums-Test bei Mäusen erhoben wurden (171,245,246).

- 4.5.3. Die Diskussion über die Östrogenversorgung der Frau unter kontrazeptiven Bedingungen verläuft zur Zeit kontrovers. Vom endokrinologischen Standpunkt aus werden die Verhältnisse während der oralen Empfängnisverhütung häufig mit jenen der Frühschwangerschaft verglichen und unter dem Aspekt bestimmter Nebenwirkungen - wie z.B. der Zunahme des Thromboembolierisikos (5,36,79,145,146,161, 186,263,276,306,307) - im Sinne einer Östrogenüberversorgung interpretiert. Aber auch die gegenteilige Ansicht wird vertreten und dabei auf das gelegentliche Auftreten von Durchbruchsblutungen, Amenorrhoe und Endometriumatrophie (18,70,78,90,106,112,127,141,149,164, 171,199,299) bzw. die sehr niedrigen Konzentrationen der körpereigenen Östrogene in Blut und Harn verwiesen (54, 163,170,301).

Unsere Untersuchungen bezüglich der Wirkung von Kombinationspräparaten auf die Transcortin-Bindungskapazität zeigen deutlich, daß allen geprüften Kontrazeptiva eine ausgeprägte Östrogen-Potenz innewohnt. Dies gilt sowohl für Medikamente mit niedrigem Östrogengehalt (ORTHO-NOVUM 1/50, Schering-Versuchspräparat SH 7.1121) wie

auch für die höherdosierte Mittel (ORTHO-NOVUM 2 mg, NEOGYNON, EUGYNON, ENAVID-E). Einen wesentlichen Anstieg der CBG-gebundenen Cortisolfraktion, der vergleichbar ist mit Werten im letzten Schwangerschaftsmonat, stellten auch LAYNE & MEYER (174), LAYNE et al. (175), DE MOOR & Mitarbeiter (65,66), die Gruppe um MUSA, DOE & SEAL (214,274) sowie PEGG & KEANE (228) fest. Ebenfalls im Sinne eines ausgeprägten Östrogen-Effektes sind andere Veränderungen der Proteinsynthese (1,6,23,24,75, 167,168,169,200,215,277,284), die Zunahme bestimmter Gerinnungsfaktoren (237,238), die Erhöhung der Serum-Triglyzeridkonzentration (288) und die Verminderung der Talgsekretion (293,294) nach der Einnahme von Kombinationspräparaten zu interpretieren.

Diese Ergebnisse entkräften die Befürchtung, daß eine ausreichende Substitution der bei der hormonalen Kontrazeption fast vollständig ruhenden Östrogensekretion durch Medikamente mit niedrigem Östrogengehalt nicht gewährleistet sei und es daher langfristig zu gravierenden Mangelerscheinungen kommen könne. Freilich mag der Zustand einer relativen Östrogenunterversorgung an den genitalen Erfolgsorganen vorgetäuscht werden, so z.B. am Endometrium durch eine Dominanz der anti-proliferativen Wirkung der Gestagenkomponente (192,298). Die Überlegenheit des Transcortin-Systems als Parameter bei der Bestimmung der Gesamt-Östrogenizität besteht darin, daß bei seiner Anwendung dieser Antagonismus quantitativ erfaßt wird und somit eine zuverlässigere Beurteilung des Östrogenmilieus möglich ist. Aber auch aus anderen Überlegungen muß der Hypothese von der Östrogenverarmung bei der oralen Empfängnisverhütung widersprochen werden. Die Eignung synthetischer Substanzen zur Substitution körpereigener Hormone darf nicht allein auf Grund von Konzentrations- und Exkretionsanalysen begutachtet werden (84, 85,298). Weder ist der Metabolismus der kontrazeptiven Steroide bisher in seinen Einzelheiten bekannt, noch sind die Voraussetzungen gegeben, sämtliche endogenen und exogenen Östrogene einschließlich ihrer Abbauproduk-

te mit den augenblicklich zur Verfügung stehenden Verfahren zu bestimmen. Daher muß bei der Überprüfung der Verwendbarkeit dieser Pharmaka deren biologische Aktivität als entscheidender Gesichtspunkt im Vordergrund stehen.

Am Kriterium der Transcortin-Bindungskapazität läßt sich mit aller Deutlichkeit demonstrieren, daß unter der konventionellen hormonalen Kontrazeption selbst bei niedrigster Dosierung erhebliche, über das normale physiologische Maß hinausgehende Östrogeneinflüsse im weiblichen Organismus zur Geltung gelangen. Da zudem keine klimakterischen Ausfallserscheinungen während der Einnahme von Einphasenpräparaten auftreten (298), erscheint aus unserer Sicht die Gefahr einer Östrogenverarmung bei Anwendung der in der BRD gebräuchlichen oralen Kontrazeptiva nicht zu bestehen.

Abschließend bleibt festzuhalten, daß weiterhin die Notwendigkeit einer differenzierten Überprüfung der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung hormonaler Kontrazeptiva besteht. Die Beeinflussung der genitalen Erfolgsorgane repräsentiert dabei nur einen Aspekt des breiten Spektrums an Wirkungen, die Sexualhormone auf den gesamten weiblichen Organismus ausüben (214). Man sollte sich deshalb bei der kritischen Begutachtung der verschiedenen Präparate nicht ausschließlich auf Untersuchungen an den primären Zielorganen beschränken, sondern zur Beurteilung der systemischen Wirksamkeit auch solche Parameter heranziehen, die - wie z.B. die Transcortin-Bindungskapazität - die Summe aller exogenen und restierenden endogenen Östrogeneinflüsse reflektieren. Besonders im Hinblick auf die umstrittenen Zusammenhänge zwischen Östrogenizität und Thromboembolierisiko (5,6,36,79,84,86,87,88,112,129,145,146,161,163,171,183,184,186,237,238,241,243,263,276,287,306,307,308) gewinnt diese Forderung an Gewicht, zumal ein Anstieg der Transcortin-Bindungskapazität als mögliche Mitursache der plasmatischen Hyperkoagulabilität diskutiert wird (70,183,247).

Infolge der relativ limitierten Aussagekraft des CBG-Bezugssystems als einem von mehreren Indikatoren der Östrogen-Potenz und angesichts der geringen Zahl der Probandinnen wie der kurzen Prüfdauer bedürfen unsere Beobachtungen einer zurückhaltenden Interpretation. Da jedoch die Reaktion der Transcortin-Konzentration auf östrogene Stimulation zweifellos sehr spezifisch ist, halten wir es für gerechtfertigt, auf Grund der mitgeteilten Resultate folgende Empfehlungen auszusprechen:

- a) Prinzipiell sollten orale Kontrazeptiva die kleinstmögliche Steroidmenge enthalten, die im Hinblick auf die kontrazeptive Sicherheit und eine ausreichende periphere Hormonversorgung vertretbar ist.
- b) Grundsätzlich sollte den biologischen Eigenschaften der Einzelkomponenten von Kombinationspräparaten mehr Bedeutung beigemessen werden.
- c) Neuentwickelte synthetische Gestagene sollten immer auf ihre Östrogen-Aktivität im Humanversuch geprüft werden (z.B. unter Nutzung des Transcortin-Indikatorsystems).
- d) Gestagene mit hoher Östrogen-Wirksamkeit (wie z.B. Norethinodrel) sollten keine Verwendung als Bestandteil hormonaler Kontrazeptiva finden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Im methodisch-experimentellen Teil dieser Arbeit wird eine Modifikation der Isotopen-Gelfiltrationstechnik zur Bestimmung der Transcortin-Bindungskapazität für Cortisol beschrieben. Das Verfahren besteht aus folgenden Schritten:

1. Entfernung der endogenen und evtl. vorhandenen exogenen Steroide aus dem Plasma durch Adsorption an Aktivkohle.
2. Sättigung der Transcortin-Bindungsstellen mit einer definierten Menge an markiertem Cortisol niedriger spezifischer Aktivität ($0,1 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$).
3. Isolierung der Transcortin-gebundenen Cortisolfraktion durch Sephadex-G-50-Gelfiltration bei 4°C .
4. Bestimmung der Transcortin-gebundenen Radioaktivität mittels Flüssigkeits-Szintillationsmessung.
5. Direkte Berechnung der Transcortin-Bindungskapazität mit Hilfe der vorgegebenen spezifischen Aktivität der Cortisol-Sättigungslösung.

Das dargelegte Verfahren erfüllt die methodischen Zuverlässigkeitskriterien. Die Einführung des Adsorptionsschrittes bringt wesentliche Verbesserungen hinsichtlich der Spezifität, Richtigkeit und Praktikabilität mit sich:

1. Ausschluß der potentiellen unspezifischen Cortisolverdrängung von den Transcortin-Bindungsstellen in vitro durch konkurrierende Steroide wie z.B. Progesteron.
2. Ermöglichung einer Isotopen-Meßtechnik zur quantitativen Endbestimmung anstelle der unzuverlässigen und aufwendigen kolorimetrischen bzw. fluorometrischen Analyse des körpereigenen Cortisolspiegels.

Die vereinfachte Methode entspricht in ihren Resultaten den aus der Literatur bekannten Werten. Die damit ermittelte Transcortin-Bindungskapazität betrug

1. bei Männern $26,1 \pm 2,3 \mu\text{g}\%$ ($n=13$), bei geschlechtsreifen Frauen $25,5 \pm 3,1 \mu\text{g}\%$ ($n=15$), bei Patientinnen ohne gonadale Östrogensekretion $24,1 \pm 2,7 \mu\text{g}\%$ ($n=8$);
2. bei Frauen im 10. Schwangerschaftsmonat $56,0 \pm 8,2 \mu\text{g}\%$ ($n=12$).

Im klinisch-experimentellen Teil wurde die Beeinflussung der Transcortin-Bindungskapazität im Plasma durch kontrazeptive Steroide bei Patientinnen ohne gonadale Östrogensekretion systematisch analysiert. Zu diesem Zweck verabreichten wir

1. nacheinander täglich 20, 40, 60, 80 und 100 µg Äthinyl-östradiol (EE) über jeweils zwei Wochen zur Festlegung der Dosis-Wirkungskurve (n=1);
2. nacheinander fünf verschiedene Einphasenpräparate (ORTHO-NOVUM 1/50 und 2 mg, Schering Versuchspräparat SH 7.1121, NEOGYNON, ENAVID-E) über jeweils drei Wochen zur quantitativen Beurteilung des Östrogenmilieus unter kontrazeptiven Bedingungen (n=4);
3. nacheinander täglich 50 sowie 100 µg Äthinylöstradiol und Mestranol (EEME) in gleicher galenischer Zubereitung über jeweils zwei Wochen zur Vergleichsprüfung der Östrogen-Potenz dieser beiden Steroide (n=4);
4. nacheinander fünf verschiedene Gestagene (täglich 5 mg Megestrolazetat, 1 mg d,l-Norgestrel, 10 mg Norethisteron, 5 mg Norethisteronazetat, 10 mg Norethinodrel) über jeweils zwei Wochen zur Ermittlung evtl. vorhandener Östrogen-Partialwirkungen (n=8).

Zusätzlich wurden zwei verschiedene Kombinationspräparate bei nicht ausgewählten, endokrinologisch gesunden Probandinnen über Zeiträume von einem Monat bis zu fünf Jahren verabfolgt, um die mögliche Auswirkung restierender endogener Östrogeneinflüsse zu bestimmen (ORTHO-NOVUM 1/50, n=20; EUGYNON, n=15).

Die Untersuchungen führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Die Transcortin-Bindungskapazität zählt zu den wenigen biologischen Indikatorsystemen, die eine spezifische Quantifizierung der systemischen Östrogen-Aktivität von Hormonpräparaten in vivo beim Menschen erlauben.
 - a. Die Kapazitätzunahme nach steigenden Gaben von Äthinyl-östradiol per os erwies sich in dem für die Kontrazeption wichtigen Bereich als linear dosisabhängig ($r = 0,9761$; $p < 0,01$).
 - b. Eine Beeinflussung durch Gestagene im Sinne eines Östrogen-Antagonismus war - im Gegensatz zu Endometrium und Vaginalepithel - nicht festzustellen.

2. Am Kriterium der Transcortin-Bindungskapazität läßt sich zeigen, daß bei Anwendung der konventionellen hormonalen Kontrazeptiva selbst in niedrigster Dosierung eine der Schwangerschaft vergleichbare endokrinologische Situation besteht; damit wird die häufig geäußerte Hypothese von der Östrogenverarmung des weiblichen Organismus widerlegt.

Die Verabfolgung der Einphasenpräparate verursachte in allen Fällen einen signifikanten Anstieg der Bindungskapazität:

50 µg EEME + 1,0 mg Norethisteron	: 45,0 ± 2,1 µg%;
35 µg EE + 0,25 mg d-Norgestrel	: 46,2 ± 2,7 µg%;
100 µg EEME + 2,0 mg Norethisteron	: 54,1 ± 5,8 µg%;
50 µg EE + 0,25 mg d-Norgestrel	: 55,5 ± 4,3 µg%;
100 µg EEME + 2,5 mg Norethinodrel	: 69,2 ± 2,9 µg%.

3. Für die Gesamt-Östrogenizität von Kombinationspräparaten sind primär die chemische Struktur und Dosierung des Östrogenanteils entscheidend. Nur ausnahmsweise spielt auch der Gestagenanteil eine Rolle. Das Ausmaß der Unterdrückung der Östrogeneigenproduktion ist zu vernachlässigen.

- a. Bei der getrennten Prüfung der Einzelkomponenten ergab sich, daß die Erhöhung der Bindungskapazität in erster Linie von der Art und Menge des Östrogenanteils abhängt:

50 µg Mestranol täglich	: 42,5 ± 6,9 µg%;
50 µg Äthinylöstradiol täglich	: 52,5 ± 5,9 µg%;
100 µg Mestranol täglich	: 57,4 ± 3,6 µg%;
100 µg Äthinylöstradiol täglich	: 63,8 ± 2,6 µg%.

Danach besitzt Mestranol nur 64% der Wirksamkeit von Äthinylöstradiol (95%-Vertrauensbereich: 39-86%).

- b. Abgesehen von Norethinodrel, nach dessen Einnahme das Bindungsvermögen auf $50,7 \pm 3,1$ µg% anstieg, wohnt den in der Empfängnisverhütung üblichen Gestagenen (Megestrolazetat, Norgestrel, Norethisteron, Norethisteronazetat) keine östrogene Partialwirkung inne.
- c. Aus dem Vergleich der Werte bei Patientinnen ohne gonadale Östrogensekretion (s. unter 2) mit den Ergebnissen bei gesunden, geschlechtsreifen Probandinnen nach Verabreichung von Kontrazeptiva gleicher Wirksamkeit ist zu folgern, daß der Grad der Einschränkung der Keimdrüsenfunktion ohne signifikanten Einfluß auf die Transcortin-Reaktion bleibt:
- | | |
|-----------------------------------|-------------------|
| 50 µg EEME + 1,0 mg Norethisteron | : 42,8 ± 5,3 µg%; |
| 50 µg EE + 0,5 mg d,1-Norgestrel | : 54,2 ± 6,4 µg%. |

LITERATURVERZEICHNIS

1. ADLERCREUTZ, H., A.EISALO, A.HEINO, T.LUNKKAINEN, I.PENT-
TILÄ, H.SANKKONEN: Investigations on the effect of an
oral contraceptive and its components on liver func-
tion, serum proteins, copper, ceruloplasmin and γ -
glutamylpeptidase in postmenopausal women. Scand. J.
Gastroent. 3, 273 (1968).
2. ALLEN, W.M.: Physiology of the corpus luteum. VIII. Inter-
relationship of oestrin and the corpus luteum as deter-
mined by their effects in the adult rabbit. Amer. J.
Physiol. 100, 650 (1932).
3. - E.A.DOISY: An ovarian hormone - Preliminary report on
its localization, extraction and partial purification,
and action in test animals. J. Amer. med. Ass. 81,
819 (1923). Zit. bei F.NEUMANN (1968).
4. APOSTOLAKIS, M., K.-D.VOIGT: VI. Statistische Grundlagen
und Beispiele. In: Gonadotropine, S.64. G.Thieme,
Stuttgart 1965.
5. ARZNEIMITTELKOMMISSION DER DEUTSCHEN ÄRZTESCHAFT: Zum
Östrogengehalt oraler Kontrazeptiva. Ärztl. Mitt.
(Köln) 67, 2268 (1970).
6. BARBOSA, J., U.S.SEAL, R.P.DOE: Effects of steroids on
plasma proteins - Progestational agents. J. clin.
Endocr. 32, 547 (1971).
7. BEIER, F.R., M.E.LAHEY, D.C.HEINER: Serum transcortin
levels in acute leukemia. Amer. J. Dis. Child. 106,
381 (1963).
8. BENNHOLD, H.: Über die Vehikelfunktion der Serumeiweiß-
körper. Ergebn. inn. Med. Kinderheilk. 42, 273 (1932).
Zit. bei U.WESTPHAL (1971).
9. BESCH, P.K., R.D.BARRY, N.VORYS, V.STEVENS, J.C.ULLERY:
A review of some aspects of the metabolism of pro-
gestational agents. Metabolism 14, 432 (1965).
10. BIGGERS, J.D., P.J.CLARINGBOLD: Criteria of the vaginal
response to estrogens. J. Endocr. 11, 277 (1954).
11. BLECHER, M.: Serum protein-steroid hormone interactions.
Effects of glucocorticoids on glucose metabolism in rat
adipose isolated cells, and the influence of human
plasma corticosteroid binding protein. Endocrinology
79, 541 (1966).
12. BOOTH, M., P.F.DIXON, C.H.GRAY, J.M.GREENAWAY, H.J.HOLNESS:
Protein binding of cortisol in health and in pregnancy.
J. Endocr. 23, 25 (1961).

13. BORTH,R.: The chromatographic method for the determination of urinary pregnanediol. Ciba Found. Coll. Endocr. 2, 45 (1952).
14. - E.DICZFALUSY, H.D.HEINTICHS: Grundlagen der statistischen Auswertung biologischer Bestimmungen. Arch. Gynäk. 188, 497 (1957).
15. BORUSHEK,S., S.BERGER: Conception control. In: Textbook of gynecologic endocrinology, p.359. Hoeber Medical Division, Harper & Row, New York 1968.
16. BRADLEY,E.M., C.WATERHOUSE: Effect of estrogen administration on extravascular cortisol. J. clin. Endocr. 26, 705 (1966).
17. BRAY,G.B.: A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. Analyt. Biochem. 1, 279 (1960).
18. BREHM,H.: Wenig Pille - wenig Probleme? Ärztl. Prax. 22, 3245 (1970).
19. BREUER,H.: Vergleichende Untersuchungen über die Aromatisierung neutraler Steroide beim Menschen. Acta endocr. (Kbh.) 40, 111 (1962).
20. - Studies on the metabolism of 17 α -ethinyl-19-nor-testosterone. Int. J. Fertil. 9, 181 (1964).
21. - Metabolism of progestogens. Lancet 2, 615 (1970).
22. - U.DARDENNE, W.NOCKE: Ausscheidung von 17-Ketosteroiden, 17-ketogenen Steroiden und Östrogenen beim Menschen nach Gaben von 17 α -Äthinyl-19-Nor-testosteron-Estern. Acta endocr. (Kbh.) 33, 10 (1960).
23. BRIGGS,M., J.AUSTIN, M.STANIFORD: Oral contraceptives and copper metabolism. Nature (Lond.) 225, 81 (1970).
24. BRIGGS,M.H., M.BRIGGS: Effect of oral ethinylestradiol on serum proteins in normal women. Contraception 3, 381 (1971).
25. BROWN,J.B., H.A.F.BLAIR: Urinary estrogen metabolites of 19-norethisterone and its ester. Proc. roy. Soc. Med. 53, 433 (1960).
26. - K.FOTHERBY, J.A.LORAIN: The effect of norethisterone and its acetate on ovarian and pituitary function during the menstrual cycle. J. Endocr. 25, 331 (1962 a).
27. - G.D.MATTHEW: The application of urinary estrogen measurements to problems in gynecology. Recent Progr. Hormone Res. 18, 337 (1962 b).

28. BURGER, A., P. LAUDAT, H. BRICAIRE: Determination de la transcortine plasmatique au cours de diverses endocrinopathies. *Acta endocr. (Kbh.)* 64, 602 (1970).
29. BURKE, C.W.: Accurate measurement of steroid-protein binding by steady-state gel filtration. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* 176, 403 (1969 a).
30. - Uncertainties in the determination of the "cortisol-binding capacity" of plasma and their removal. *J. clin. Path.* 22, 683 (1969 b).
31. BUSH, I.E.: The physicochemical state of cortisol in blood. *Ciba Found. Coll. Endocr.* 11, 263 (1957).
32. BUTLER, J., P.F. DIXON: The binding of cortisol to CBG and albumin in plasma from women during the menstrual cycle and in pregnancy. *Ann. Endocr. (Paris)* 30, 217 (1969).
33. CAVALLI-SFORZA, L.: Biometrie - Grundzüge biologisch-medizinischer Statistik. G. Fischer, Stuttgart 1972.
34. CHEN, P.S., I.H. MILLS, F.C. BARTTER: Ultrafiltration studies of steroid-protein binding. *J. Endocr.* 23, 129 (1961).
35. COHEN, M., M. STIEFEL, W.J. REDDY, J.C. LAIDLAW: The secretion and disposition of cortisol during pregnancy. *J. clin. Endocr.* 18, 1076 (1958).
36. COMMITTEE ON SAFETY OF DRUGS: Combined oral contraceptives. *Brit. med. J.* 2, 231 (1970).
37. CORVOL, P.L., A. CHRAMBACH, D. RODBARD, W. BARDIN: Physical properties and binding capacity of testosterone-estradiol-binding globulin in human plasma, determined by polyacrylamide gel electrophoresis. *J. biol. Chem.* 246, 3435 (1971).
38. COURRIER, R.: Interactions between estrogens and progesterone. *Vitam. and Horm.* 8, 179 (1950).
39. CUSHMAN, P., Jr., S. ALTER, J.G. HILTON: Effects of clomiphene on oestradiol alterations in thyroxine and cortisol transport in man. *Acta endocr. (Kbh.)* 50, 329 (1965).
40. DAUGHADAY, W.H.: Evidence for two corticosteroid binding systems in human plasma. *J. Lab. clin. Med.* 48, 799 (1956 a).
41. - Binding of corticosteroids by plasma proteins. I. Dialysis equilibrium and renal clearance studies. *J. clin. Invest.* 35, 1428 (1956 b).
42. - Binding of corticosteroids by plasma proteins. II. Paper electrophoresis and equilibrium paper electrophoresis. *J. clin. Invest.* 35, 1434 (1956 c).

43. - Corticosteroid binding by a plasma α -globulin. J. clin. Invest. 36, 881 (1957).
44. - Binding of corticosteroids by plasma proteins. V. Corticosteroid-binding globulin activity in normal human beings and in certain disease states. Arch. intern. Med. 101, 286 (1958 a).
45. - Binding of corticosteroids by plasma proteins. III. The binding of corticosteroid and related hormones by human plasma and plasma protein fractions as measured by equilibrium dialysis. J. clin. Invest. 37, 511 (1958 b).
46. - Binding of corticosteroids by plasma proteins. IV. The electrophoretic demonstration of corticosteroid binding globulin. J. clin. Invest. 37, 519 (1958 c).
47. - Steroid protein interactions. Physiol. Rev. 39, 885 (1959 a).
48. - R.E.ADLER, I.K.MARIZ, D.C.RASINSKI: Measurement of the binding capacity of corticosteroid-binding globulin in human plasma. J. clin. Endocr. 22, 704 (1962).
49. - R.BREMER: The association of 17-OH corticosteroids and 17-OH corticosteroid glucuronides with plasma proteins and the mechanism of corticosteroid excretion. J. Lab. clin. Med. 46, 807 (1955).
50. - J.HOLLOSZY, I.K.MARIZ: Binding of corticosteroids by plasma proteins. VI. The binding of cortisol and aldosterone by corticosteroid-binding globulin and by the estrogen-induced binding system of plasma. J. clin. Endocr. 21, 53 (1961 a).
51. - I.KOZAK, O.BIEDERMAN: Corticosteroid-binding globulin activity in body fluids and in fetal and maternal plasma. J. clin. Invest. 38, 998 (1959 b).
52. - I.K.MARIZ: Corticosteroid-binding globulin: Its properties and quantitation. Metabolism 10, 936 (1961 b).
53. DAVID, A., K.EDWARDS, K.P.FELLOWS, J.M.PLUMMER: Anti-ovulatory and other biological properties of megestrol acetate, 17 α -acetoxy-6-methyl-pregna-4:6-diene-3:20-dione. J. Reprod. Fertil. 5, 331 (1963).
54. DEFARES, J.G.: De invloed van orale anticonceptiva op de vrouw. Ned. T. Geneesk. 111, 1115 (1967).
55. DELFORGE, J.P., J.FERIN: A histometric study of two estrogens: Ethinyl-estradiol and its 3-methyl-ether derivative (mestranol); their comparative effect upon the growth of the human endometrium. Contraception 1, 57 (1970).

56. DE MOOR, P., R. DECKX, J. RAUS, C. DENEFF: About the possible influence of transcortin on the catabolism of cortisol in the liver. *Metabolism* 12, 592 (1963 a).
57. - - O. STEENO: Influence of various steroids on the specific binding of cortisol. *J. Endocr.* 27, 355 (1963 b).
58. - K. HEIRWEGH, J. F. HEREMANS, M. DECLERCK-RASKIN: Protein binding of corticoids studied by gel filtration. *J. clin. Invest.* 41, 816 (1962).
59. - A. HENDRIKX, O. STEENO: Ideopathic lowering of cortisol binding capacity of human plasma transcortin. *Ann. Endocr. (Paris)* 26, 488 (1965 a).
60. - W. HEYNS: Cortisol binding affinity of plasma transcortin (CBA) as studied by competitive adsorption. *J. clin. Endocr.* 28, 1281 (1968).
61. - E. MEULEPAS, A. HENDRIKX, W. HEYNS, H. G. VANDENSCHRIECK: Cortisol-binding capacity of plasma transcortin: A sex-linked trait? *J. clin. Endocr.* 27, 959 (1967).
62. - H. ROELS, K. DELAERC, J. CRABBE: Unusual case of adrenocortical function. *J. clin. Endocr.* 25, 612 (1965 b).
63. - O. STEENO: About the existence in or on erythrocytes of a specific cortisol binding agent. *J. Endocr.* 26, 301 (1963 c).
64. - - Influence of synthetic steroids with anabolic and progestational activity on the specific binding of cortisol. *J. Endocr.* 32, 123 (1965 c).
65. - - The biological role of the cortisol-binding globulin (CBG) in plasma. *Verh. vlaam. Akad. Geneesk. Belg.* 27, 675 (1965 d).
66. - - I. BROSENS, A. HENDRIKX: Data on transcortin activity in human plasma as studied by gel filtration. *J. clin. Endocr.* 26, 71 (1966).
67. - - R. DECKX: Factors affecting the binding of cortisol by transcortin. *Acta endocr. (Kbh.)* 44, 107 (1963 d).
68. - - A. HENDRIKX: Clinical features observed in patients with an unexplained low cortisol-binding capacity. *Acta endocr. (Kbh.)* 48, 272 (1965 e).
69. - M. RASKIN, A. HENDRIKX: Fluorometric determination of free plasma 11-hydroxycorticosteroids in man. *Acta endocr. (Kbh.)* 33, 297 (1960).
70. DICKEY, R. P., C. DORR: Oral contraceptives: Selection of the proper pill. *Obstet. and Gynec.* 33, 273 (1969).
71. DIXON, P. F.: The kinetics of the exchange between transcortin-bound and unbound cortisol in plasma. *J. Endocr.* 40, 457 (1968).

72. DODEK, O.I., JR., E.I. SEGRE, E.L. KLAIBER: Effect of Enovid on cortisol metabolism. *Amer. J. Obstet. Gynec.* 93, 173 (1965).
73. DOE, R.P., R. FERNANDEZ, U.S. SEAL: Measurement of corticosteroid-binding globulin in man. *J. clin. Endocr.* 24, 1029 (1964).
74. - F.N. LOHRENZ, U.S. SEAL: Familial decrease in corticosteroid-binding globulin. *Metabolism* 14, 940 (1965).
75. - G.T. MELLINGER, W.R. SWAIM, U.S. SEAL: Estrogen dosage effects on serum proteins: A longitudinal study. *J. clin. Endocr.* 27, 1081 (1967).
76. - U.S. SEAL: Protein binding of cortisol in man. *J. clin. Invest.* 42, 929 (1963).
77. - H.H. ZINNEMAN, E.B. FLINK, R.A. ULSTROM: Significance of the concentration of nonprotein-bound plasma cortisol in normal subjects, Cushing's syndrome, pregnancy and during estrogen therapy. *J. clin. Endocr.* 20, 1484 (1960).
78. DÖRING, G.K.: Differenzierter Einsatz von Ovulationshemmern. *Ärztl. Mitt. (Köln)* 67, 1360 (1970).
79. DOLL, R., M.P. VESSEY: Evaluation of rare adverse effects of systemic contraceptives. *Brit. med. Bull.* 26, 33 (1970).
80. DORFMAN, R.I., F.A. KINCL: Uterotrophic activity of various phenolic steroids. *Acta endocr. (Kbh.)* 52, 619 (1966).
81. - - H.J. RINGOLD: Anti-estrogen assay of neutral steroids administered by gavage. *Endocrinology* 68, 43 (1961).
82. DRILL, V.A.: Biological effects of some steroids with progestational activity. *Fed. Proc.* 18, 1040 (1959).
83. - Endocrine properties of norethindrone and related steroids. *J. Endocr.* 24, XVII (1962).
84. - Endocrine properties and long-term safety of oral contraceptives. *Metabolism* 14, 295 (1965).
85. - Oral contraceptives. McGraw-Hill, New York 1966.
86. - Oral contraceptives and thromboembolic disease. I. Prospective and retrospective studies. *J. Amer. med. Ass.* 219, 583 (1972 a).
87. - D.W. CALHOUN: Oral contraceptives and thromboembolic disease. *J. Amer. med. Ass.* 206, 77 (1968).
88. - - Oral contraceptives and thromboembolic disease. II. Estrogen content of oral contraceptives. *J. Amer. med. Ass.* 219, 593 (1972 b).

89. - F.J.SAUNDERS: Biological activity of norethynodrel. In: Proc. Symp. 19-Nor Progestational Steroids, p.5. Searle Research Laboratories, Chicago 1957.
90. ECKSTEIN, P., J.A.H.WATERHOUSE, G.M.BOND, W.G.NILLS, D.N. SANDILANDS, D.M.SHOTTON: The Birmingham oral contraceptive trial. Brit. med. J. 2, 1172 (1963).
91. EDGREN, R.A.: Notes on impeded estrogens. Proc. Soc. exp. Biol. 92, 569 (1956).
92. - The uterine-growth stimulating activities of 17 α -ethinyl-17-OH-5(10)-estren-3-one (norethynodrel) and 17 α -ethinyl-19-nortestosterone. Endocrinology 62, 689 (1958).
93. - Oestrogen antagonisms: Temporal modalities in steroid block of oestrone-induced changes in vaginal smears of mice. Acta endocr. (Kbh.) 34, 536 (1960 a).
94. - Estrogen antagonisms: Effects of a series of 19-nortestosterone derivatives on vaginal changes induced by estrone. Proc. Soc. exp. Biol. 105, 252 (1960 b).
95. - Estrogen antagonisms: Relationship between estrogen and progestational potencies of Δ 4-3-oxosteroids. Proc. Soc. exp. Biol. 123, 788 (1966 a).
96. - D.W.CALHOUN: Estrogen antagonisms: Inhibition of estrone-induced uterine growth by testosterone propionate, progesterone and 17-ethyl-19-nortestosterone. Proc. Soc. exp. Biol. 94, 537 (1957 a).
97. - - Interaction of estrogens on the vaginal smear of spayed rats. Amer. J. Physiol. 189, 355 (1957 b).
98. - - Oestrogen antagonisms: The effects of various steroids on the uterine growth produced in mice by oestriol. Experientia (Basel) 16, 188 (1960 c).
99. - - R.L.ELTON, F.B.COLTON: Estrogen antagonisms: The effects of a series of relatives of 19-nortestosterone on estrone-induced uterine growth. Endocrinology 65, 265 (1959).
100. - R.C.JONES, D.L.PETERSON: A biological classification of progestational agents. Fertil. and Steril. 18, 238 (1967 a).
101. - - A.L.GIELEN: Studies on the interactions of ethinyl-oestradiol and norgestrel. Acta endocr. (Kbh.) Suppl. 115, 1 (1967 b).
102. - D.L.PETERSON, R.C.JONES, C.L.NAGRA, H.SMITH, G.A. HUGHES: Biological effects of synthetic gonanes. Recent Progr. Hormone Res. 22, 305 (1966 b).

103. - H.SMITH, G.A.HUGHES, L.L.SNITH, G.GREENSPAN: Biological effects of racemic and resolved 13 β -ethyl-4-gonen-3-ones. Steroids 2, 731 (1963 a).
104. - - D.L.PETERSON, D.L.CARTER: The biological effects of a series of 13 β -substituted gonanes related to nor-ethindrone (17 α -ethinyl-19-nortestosterone). Steroids 2, 319 (1963 b).
105. EDITORIAL: Which pill? Brit. med. J. 3, 627 (1967).
106. - Today's drugs: Oral contraceptives - Choice of product. Brit. med. J. 1, 690 (1968).
107. ELTON,R.L., R.A.EDGREN: Biological actions of 17 α -(2-methylallyl)-19-nortestosterone, an orally active progestational agent. Endocrinology 63, 464 (1958).
108. - - D.W.CALHOUN: Biological activities of some 6-methylated progesterones. Proc. Soc. exp. Biol. 103, 175 (1960).
109. EMMENS,C.W., B.G.MILLER: Estrogens, Proestrogens and Antiestrogens. Steroids 13, 725 (1969).
110. ENGEL,L.L., J.ALEXANDER, M.WHEELER: Urinary metabolites of administered 19-nortestosterone. J. biol. Chem. 231, 159 (1958).
111. FARESE,R., J.E.PLAGER: The in vitro red blood cell uptake of C-14-cortisol; studies of plasma protein binding of cortisol in normal and abnormal states. J. clin. Invest. 41, 53 (1962).
112. FELDMANN,H.U., R.CALLIES: Zur individuell angepaßten Therapie mit hormonalen Kontrazeptiva. Med. Ass. 4 (4), 23 (1972).
113. FLODIN,P.: Methodological aspects of gel filtration with special reference to desalting operations. J. Chromatogr. 5, 103 (1961).
114. FORBES,T.R.: Synergisms and antagonisms of testosterone: progesterone and estradiol-17 β :estrone:progesterone mixtures in a uterine bioassay in the mouse. Endocrinology 83, 411 (1968).
115. FOTHERBY,K.: The pharmacokinetics of contraceptive steroids in humans. In: Nebenwirkungen contraceptiver Steroide, S.18. Westkreuz, Berlin 1971.
116. - S.KANYAB, P.LITTLETON, A.I.KLOPPER: Metabolism of synthetic progestational compounds in humans. J. Reprod. Fertil. Suppl.5, 51 (1968 a).
117. - - G.WILSON: The metabolism in man of 17 α -ethinyl-19-nortestosterone and related compounds. J. Endocr. 40, XV (1968 b).

118. FOTHERGILL, J.E., R.C.NAVIN: Purification of fluorescent protein conjugates: Comparison of charcoal and Sephadex. *Nature (Lond.)* 192, 1073 (1961).
119. FRANCHIMONT, P., J.J.LEGROS, J.MEURICE: Effect of several estrogens on serum gonadotropin levels in postmenopausal women. *Horm. Metab. Res.* 4, 288 (1972).
120. FREED, S.C., W.M.EISIN, J.P.GREENHILL: The oral effectiveness of estrone sulfate (conjugated estrogens-equine) in women. *J. clin. Endocr.* 3, 89 (1943).
121. GELOTTE, B.: Studies on gel filtration sorption properties of the bed material Sephadex. *J. Chromatogr.* 3, 330 (1960).
122. GOLD, J.J.: Comparative effects of newer available progestins. In: *Textbook of gynecologic endocrinology*, p.551. Hoeber Medical Division, Harper & Row, New York 1968.
125. GOLDIE, D.J., N.HASHAM, P.M.KEANE, J.PEARSON, W.H.C. WALKER: Cortisol binding characteristics measured by dialysis. *J. Endocr.* 43, 127 (1969).
124. - - W.H.C.WALKER: Temperature dependence of cortisol binding to plasma proteins. *Nature (Lond.)* 217, 852 (1968).
125. GOLDZIEHER, J.W., J.MARTINEZ-MANAUTOU, N.B.LIVINGSTONE: The use of sequential estrogen and progestin to inhibit fertility: A preliminary report. *Western J. Surg. Obstet. Gynec.* 71, 187 (1963). *Zit. bei V.A. DRILL & D.W.CALHOUN* (1972 b).
126. - E.RICE-WRAY: Oral contraception: Mechanism and management. Thomas, Springfield, Ill. 1966. *Zit. bei R.P. DICKEY & C.DORR* (1969).
127. GRANT, E.C.G.: Hormone balance of oral contraceptives. *J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth.* 74, 908 (1967).
128. - Relation between headaches from oral contraceptives and development of endometrial arterioles. *Brit. med. J.* 3, 402 (1968).
129. - Venous effects of oral contraceptives. *Brit. med. J.* 4, 73 (1969).
130. GRAY, L.A.: Clinical study of a new type of estrogenic preparation for oral use. *J. clin. Endocr.* 3, 92 (1943).
131. GREENBLATT, R.B., E.C.JUNGCK: Delay of menstruation with norethindrone, an orally given progestational compound. *J. Amer. med. Ass.* 166, 1461 (1958).
132. GUAL, C., C.BECERRA, E.RICE-WRAY, J.W.GOLDZIEHER: Inhibition of ovulation by estrogens. *Amer. J. Obstet. Gynec.* 97, 443 (1967).

133. GUERIGUIAN, J., W.H. PEARLMAN: Separation of testosterone-binding protein of human pregnancy serum from CBG. Fed. Proc. 26, 757 (1967).
134. HAHN, D.W., J.L. MCGUIRE, F.C. GREENSLADE, G.D. TURNER: Molecular parameters involved in the estrogenicity of mestranol and ethynylestradiol. Proc. Soc. exp. Biol. 137, 1180 (1971).
135. HALLER, J.: Die antikonzeptionelle Therapie. In: Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Bd. 12: Die Gestagene, Teil 1, S. 1125. Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1968.
136. - Welche Dosen von Östrogenen und Gestagenen sind für die kontrazeptive Wirkung ausreichend? In: Nebenwirkungen contraceptiver Steroide, S. 192. Westkreuz, Berlin 1971.
137. HAMMERSTEIN, J.: Theoretische Grundlagen der hormonalen Kontrazeption. Med. Klin. 65, 1279 (1970).
138. - Die als Kontrazeptiva gebräuchlichen Östrogene und Gestagene. In: Nebenwirkungen contraceptiver Steroide, S. 10. Westkreuz, Berlin 1971.
139. - Neuere Verfahren der hormonalen Contraception. Gynäkologe 5, 120 (1972).
140. HEINEN, G.: Klinische Erfahrung in der hormonalen Ovulationshemmung mit der Sequentialmethode unter Verwendung von Chlormadinonazetat und Mestranol in verschiedenen Dosierungen. Med. Welt (Stuttg.) 44, 2420 (1969).
141. - Die differenzierte Anwendung von Kombinations- und Sequentialpräparaten in der hormonalen Ovulationshemmung. Prakt. Arzt 7, 1159 (1970).
142. HEYNS, W., H. VAN BAELEN, P. DE MOOR: Study of steroid-protein binding by means of competitive adsorption: Application to cortisol binding in plasma. Clin. chim. Acta 18, 361 (1967).
143. - - - Study of steroid-protein binding by means of competitive adsorption: A theoretical and graphic analysis of the steroid distribution. Ann. Endocr. (Paris) 29, 123 (1968).
144. HOFFMANN, W., U. WESTPHAL: Steroid-protein interactions. XXII. Extrapolation technique for determination of corticosteroid-binding globulin by gel filtration. Analyt. Biochem. 32, 48 (1969).
145. INMAN, W.H.W.: The investigation of thrombosis and the "pill", with special reference to studies conducted by the Committee on Safety of Drugs. In: Nebenwirkungen contraceptiver Steroide, S. 36. Westkreuz, Berlin 1971.

146. - M.P.VESSEY, B.WESTERHOLM, A.ENGELEND: Thromboembolic disease and the steroidal content of oral contraceptives. Brit. med. J. 2, 203 (1970).
147. JACKSON, J.L., W.T.SPAIN, H.PAYNE: The antiovlatory dose of ethynylestradiol. Fertil. and Steril. 19, 649 (1968).
148. JACKSON, M.C.N.: Comparison of norethynodrel and norethisterone in patients. J. Endocr. 24, XXVI (1962).
149. - Oral contraception in practice. J. Reprod. Fertil. 6, 153 (1963).
150. JUNKMANN, K.: Experimentelle Gesichtspunkte bei der Prüfung synthetischer Gestagene. Dtsch. med. Wschr. 88, 629 (1963).
151. - Die tierexperimentelle Prüfung antikonzeptioneller Steroide. Internist (Berl.) 5, 237 (1964).
152. - Chemie der Gestagene. In: Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Bd.12: Die Gestagene, Teil 1, S.1. Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1968.
153. KAISER, R.: Über die Zunahme von Harnöstrogenen bei Verwendung von 19-Nortestosteron. Dtsch. med. Wschr. 85, 1457 (1960).
154. - The inhibition of ovulation with oral progestative substances. Int. J. Fertil. 9, 87 (1964).
155. KAMYAB, S., K.FOTHERBY, A.I.KLOPPER: Metabolism of (4-14C)-norethisterone in women. J. Endocr. 41, 263 (1968).
156. KAPPUS, H., H.M.BOLT, H.RENNER: Demethylation of mestranol to ethinyloestradiol in vitro and in vivo. Acta endocr. (Kbh.) 71, 374 (1972).
157. KATZ, F.H., A.KAPPAS: The effects of estradiol and estriol on plasma levels of cortisol and thyroid-binding globulins and on aldosterone and cortisol secretion rates in man. J. clin. Invest. 46, 1768 (1967).
158. KAWAI, A., F.E.YATES: Interference with feedback inhibition of adrenocorticotropin release by protein binding of corticosterone. Endocrinology 79, 1040 (1966).
159. KEANE, P.M., J.PEARSON, W.H.C.WALKER: Binding characteristics of transcortin in human plasma in normal individuals, pregnancy and liver disease. J. Endocr. 43, 571 (1969).
160. KETCHEL, M.M., E.GARABEDIAN: Studies on the binding of cortisol-4-C-14 by human leucocytes in vitro. Acta endocr. (Kbh.) 42, 12 (1963).

161. KEWITZ, H.: Schlußfolgerungen und Empfehlungen für die Praxis. In: Nebenwirkungen contraceptiver Steroide, S.230. Westkreuz, Berlin 1971.
162. KINCL, F.A., R.I.DORFMAN: The biological activity of estrogen-free norethindrone. Proc. Soc. exp. Biol. 119, 340 (1965).
163. KLOPPER, A.: Developments in steroidal hormonal contraception. Brit. med. Bull. 26, 39 (1970).
164. KRAUSE, J., H.STAMM: Die Beurteilung hormonaler Konstitutionsvarianten im Hinblick auf die Verordnung von oralen Kontrazeptiva. Fortschr. Geb. Gynäk. 42, 57 (1970).
165. KRIPALANI, K.J., D.L.SORBY: Binding of cortisol and its degradation products by human serum albumin. J. pharm. Sci. 56, 687 (1967).
166. LANGECKER, H.: Die Metabolite im menschlichen Harn nach Verabreichung von 17 α -aethinyl-19-Nortestosterone (Noraethisterone). Acta endocr. (Kbh.) 37, 14 (1961).
167. LARAGH, J.H., J.E.SEALEY, J.G.G.LEDINGHAM, M.A.NEWTON: Oral contraceptives. Renin, aldosterone and high blood pressure. J. Amer. med. Ass. 201, 918 (1967).
168. LAURELL, C.B., S.KULLANDER, J.THORELL: Effect of administration of a combined estrogen-progestin contraceptive on the level of individual plasma proteins. Scand. J. clin. Lab. Invest. 21, 337 (1967).
169. - - - Plasma protein changes induced by sequential type of contraceptive steroid pills. Clin. chim. Acta 25, 294 (1969).
170. LAURITZEN, C.: On endocrine effects of oral contraceptives. Acta endocr. (Kbh.) Suppl.124, 87 (1967).
171. - Welche Dosen von Östrogenen und Gestagenen sind für die kontrazeptive Wirkung ausreichend? In: Nebenwirkungen contraceptiver Steroide, S.204. Westkreuz, Berlin 1971.
172. LAUSON, H.D., C.G.HELLER, J.B.GOLDEN, E.L.SEVERINGHAMS: The immature rat uterus in the assay of oestrogenic substances and a comparison of oestradiol, oestrone oestriol. Endocrinology 24, 35 (1939).
173. LAYNE, D.S., T.GOLAB, K.ARAI, G.PINCUS: The metabolic fate of orally administered 3H-norethynodrel and 3H-norethindrone in humans. Biochem. Pharmacol. 12, 905 (1963).
174. - C.J.MEYER: Effects of 19-norsteroids on plasma-protein binding of hormones. Metabolism 14, 429 (1965).

175. - P.S.VAISHWANAR, G.PINCUS: The secretion and metabolism of cortisol and aldosterone in normal and steroid-treated women. *J. clin. Endocr.* 22, 107 (1962).
176. LEBEAU, M.C., C.MERCIER-BODARD, J.OLDS, D.BOURQUIN, T.BRECY, J.P.RAYNAUD, E.E.BAULIEU: Mesure de la liaison de la corticostérone, du sulfate de corticostérone, de la testostérone et de l'oestradiol a les protéines du plasma. *Ann. Endocr. (Paris)* 30, 183 (1969). Zit. bei U.WESTPHAL (1971).
177. LEE, A.E.: The limitations of using mouse uterine weight as an assay of estrogen antagonism. *Acta endocr. (Kbh.)* 67, 345 (1971).
178. LEYBOLD, K., J.RIEPER, L.WEISSBECKER: Enzymatisch-fluorimetrische Bestimmung der Cortisolbindungskapazität des Plasmas. *Acta endocr. (Kbh.)* 56, 99 (1967).
179. LINDNER, H.R.: Comparative aspects of cortisol transport: Lack of firm binding to plasma proteins in domestic ruminants. *J. Endocr.* 28, 301 (1964).
180. LITTLETON, P., K.FOTHERBY, K.J.DENNIS: Metabolism of (14-C)-norgestrel in man. *J. Endocr.* 42, 591 (1968).
181. LONG, R.C., J.T.BRADBURY: Induction and maintenance of decidual changes with progesterone and estrogen. *J. clin. Endocr.* 11, 134 (1951).
182. LORAIN, J.A., E.T.BELL, R.A.HARKNESS, E.MEARS, M.C.N. JACKSON: Hormone excretion patterns during and after long-term administration of oral contraceptives. *Acta endocr. (Kbh.)* 50, 15 (1965).
183. LUDWIG, H.: Ovulationshemmer, Hämostase und Gefäßkomplikationen. *Gynäkologe* 2, 195 (1970).
184. - Das Risiko von Thrombose und Embolie unter der Anwendung kontraceptiver Steroide. In: Nebenwirkungen kontraceptiver Steroide, S.48. Westkreuz, Berlin 1971.
185. MAQUEO, M., E.PEREZ-VEGA, J.W.GOLDZIEHER, J.MARTINEZ-MANAUTOU, H.W.RUDEL: A comparison of the endometrial activity of three synthetic progestins. *Amer. J. Obstet. Gynec.* 85, 247 (1963).
186. MARKUSH, R.E., D.G.SEIGEL: Oral contraceptives and mortality trends from thromboembolism in the U.S. *Amer. J. publ. Hlth.* 59, 418 (1969). Zit. bei H. LUDWIG (1970).
187. MARSHALL, J.C., D.C.ANDERSON, C.W.BURKE, A.GALVAO-TELES, F.T.RUSSELL: Clomiphene citrate in man: Increase of cortisol, luteinizing hormone, testosterone and steroid-binding globulins. *J. Endocr.* 53, 261 (1972).

188. MARTIN, L.: The use of 2-3-5-triphenyl tetrazolium chloride in the biological assay of oestrogens. *J. Endocr.* 20, 187 (1960 a).
189. - Further studies on the use of tetrazolium in the biological assay of oestrogens. *J. Endocr.* 30, 21 (1964 a).
190. - The uptake of locally applied (6:7-³H) estradiol-17 β by the vagina of the ovariectomized mouse. *J. Endocr.* 30, 337 (1964 b).
191. - P.J. CLARINGBOLD: A highly sensitive assay for estrogens. *Nature (Lond.)* 181, 620 (1958).
192. - K. CUNNINGHAM: Suppression of pituitary gonadotropins by 17-ethynyl-19-nortestosterone in patients with metastatic carcinoma of the breast. *J. clin. Endocr.* 20, 529 (1960 b).
193. - C.A. FINN: Interactions of estradiol and progestins in the mouse uterus. *J. Endocr.* 48, 109 (1970).
194. MARTINEZ-MANAUTOU, J., C. GUAL, J.W. GOLDZIEHER, H.W. RUDEL: Comparative anti-ovulatory potency of certain natural and synthetic estrogens. *Proc. Endocr. Soc. 46th Annual Meeting*, p.118. San Francisco 1964. *Zit. bei J.P. DELFORGE & J. FERIN (1970)*.
195. - M. MAQUEO, E. PEREZ-VEGA, J.W. GOLDZIEHER, H.W. RUDEL: Funcion hipofisiaria et imagen histologica del endometrio observado con el uso esteroides antiovariatorios. XI. Reunion Nacional de Ginecologia y Obstetricia, Guadalajara, Mexico 1962. *Zit. bei H.W. RUDEL u.a. (1965)*.
196. McDONALD, P.G.: The effect of a single injection of norethindrone, with or without estrogen, on ovulation in the rat. *J. Endocr.* 41, V (1968).
197. McGINTY, D., C. DJERASSI: Some chemical and biological properties of 19-nor-17 α -ethynyl-testosterone. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 71, 500 (1958).
198. McKINNEY, G.R., J.P. BRAZELTON: Antiandrogenic and anti-uterotropic activities of three synthetic progestagens. *Steroids* 15, 405 (1970).
199. MEARS, E.: Clinical trials of oral contraceptives. *Brit. med. J.* 2, 1179 (1961).
200. MEYER, C.J., D.S. LAYNE, J.F. TAIT, G. PINCUS: The binding of aldosterone to plasma proteins in normal, pregnant, and steroid-treated women. *J. clin. Invest.* 40, 1663 (1961).
201. MIGEON, C.J., J. BERTRAND, P.E. WALE: Physiological disposition of 4-C-14-cortisol during late pregnancy. *J. clin. Invest.* 36, 1350 (1957).

202. MILGROM, E., E.E.BAULIEU: A method for studying binding proteins, based upon differential dissociation of small ligands. *Biochim. biophys. Acta* (Amst.) 194, 602 (1969).
203. MILLER, B.G., C.W.EMMENS: The incorporation of tritiated uridine in the genital tract of the oestrogen-treated mouse. *J. Endocr.* 39, 473 (1967).
204. MILLS, I.H.: Diskussionsbeitrag zu R.E.PETERSON (1959). *Recent Progr. Hormone Res.* 15, 261 (1959 a).
205. - The transport state of steroid hormones. *Soc. Endocrinol.*, Memoir No.11, p.81 (1961). Zit. bei U.WESTPHAL (1971).
206. - Transport and metabolism of steroids. *Brit. med. Bull.* 18, 127 (1962).
207. - F.C.BARTTER: The effect of oestrogen administration on the protein binding and metabolism of hydrocortisone. *J. Endocr.* 18, V (1959 b).
208. - P.S.CHEN, F.C.BARTTER: The protein-binding of steroids as studied by ultrafiltration. *J. Endocr.* 18, XXX (1959 c).
209. - H.P.SCHEDL, P.S.CHEN, F.C.BARTTER: The effect of estrogen administration on the metabolism and protein binding of hydrocortisone. *J. clin. Endocr.* 20, 515 (1960).
210. MULDOON, T.G., U.WESTPHAL: Steroid-protein interactions. XV. Isolation and characterization of corticosteroid-binding globulin from human plasma. *J. biol. Chem.* 242, 5636 (1967).
211. MURPHY, B.E.P.: Some studies of the protein-binding of steroids and their application to the routine micro and ultramicro measurement of various steroids in body fluids by competitive protein-binding radioassay. *J. clin. Endocr.* 27, 973 (1967).
212. - C.J.PATTEE: A study of the binding capacity of corticosteroid-binding globulin in plasma. *J. clin. Endocr.* 23, 459 (1963).
213. MURRAY, D.: Cortisol binding to plasma proteins in man in health, stress and at death. *J. Endocr.* 39, 571 (1967).
214. MUSA, B.U., R.P.DOE, U.S.SEAL: Serum protein alterations produced in women by synthetic estrogens. *J. clin. Endocr.* 27, 1463 (1967).
215. - U.S.SEAL, R.P.DOE: Elevation of certain plasma proteins in man following estrogen administration: A dose-response relationship. *J. clin. Endocr.* 25, 1163 (1965).

216. NELSON, D.H., H. TANNEY, G. MESTMAN, V. GIESCHEN, L.D.
WILSON: Potentiation of the biologic effect of administered cortisol by estrogen treatment. J. clin. Endocr. 23, 261 (1963).
217. NEUMANN, F.: unveröffentlichte Ergebnisse. Zit. bei J. UFER (1972).
218. - Chemische Konstitution und pharmakologische Wirkung.
In: Handbuch der experimentellen Pharmakologie.
Bd. 12: Die Gestagene, Teil 1, S. 680. Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1968.
219. - W. ELGER: Kritische Überlegungen zu den biologischen Grundlagen von Toxizitätsstudien mit Steroid-(sexual-)hormonen. In: Methodik der Steroidtoxikologie, S. 6. G. Thieme, Stuttgart 1971.
220. NISHINO, Y., F. NEUMANN: Untersuchungen zur oestrogenen und antioestrogenen Wirkung von Gestagenen, gemessen am Sialinsäuregehalt der Mäusevagina. 17. Symp. der Dtsch. Gesellschaft für Endokrinologie, Hamburg 1971. Zit. bei F. NEUMANN & W. ELGER (1971).
221. NUGENT, C.A., D.M. MAYES: Plasma corticosteroids determined by use of corticosteroid-binding globulin and dextran-coated charcoal. J. clin. Endocr. 26, 1116 (1966).
222. OHTSUKA, E., S.S. KOIDE: Binding of cortisol and 21-dehydrocortisol with transcortin. Endocrinology 83, 999 (1968).
223. OSORIO, C., D.L. SCHATS: Determination of the binding capacity of corticosteroid-binding globulin by paper electrophoresis. J. clin. Endocr. 24, 1067 (1964).
224. PAULSEN, C.A.: Progestin metabolism: Special reference to estrogenic pathways. Metabolism 14, 313 (1965).
225. - R.B. LEACH, J. LANMAN, N. GOLDSTON, W.O. MADDOCK, C.G. HELLER: Inherent estrogenicity of norethindrone and norethynodrel: Comparison with other synthetic progestins and progesterone. J. clin. Endocr. 22, 1033 (1962).
226. PEARLMAN, W.H., O. CREPY: Steroid-protein interaction with particular reference to testosterone binding by human serum. J. biol. Chem. 242, 182 (1967).
227. PEARSON, J., P.M. KEANE, W.H.C. WALKER: Binding of cortisol to human albumin. Nature (Lond.) 216, 1334 (1967).
228. PEGG, P.J., P.M. KEANE: The simultaneous estimation of plasma cortisol and transcortin binding characteristics by a competitive protein binding technique. Steroids 14, 705 (1969).

229. PETERSON, R.E.: The miscible pool and turnover rate of adrenocortical steroids in man. Recent Progr. Hormone Res. 15, 231 (1959).
230. - A.KARRER, S.L.GUERRA: Evaluation of Silber-Porter procedure for determination of plasma hydrocortisone. Analyt. Chem. 29, 144 (1957).
231. - G.NOKES, P.S.CHEN, R.L.BLACK: Estrogens and adrenocortical function in man. J. clin. Endocr. 20, 495 (1960).
232. PINCUS, G., M.C.CHANG, E.S.E.HAFEZ, M.X.ZARROW, A.MERRILL: Effects of certain 19-nor steroids on reproductive processes in animals. Science 124, 890 (1956 a).
233. - M.X.ZARROW, E.S.E.HAFEZ, A.MERRILL: Studies of the biological activity of certain 19-nor steroids in female animals. Endocrinology 59, 695 (1956 b).
234. PIRKE, K.M., D.STAMM: Eine einfache Methode zur Bestimmung der Kapazität des Corticosteroidbindenden Globulins im Plasma. Acta endocr. (Köln.) 70, 515 (1972).
235. PLAGER, J.E., R.KNOPP, W.R.SLAUNWHITE Jr., A.A.SANDBERG: Cortisol binding by dog plasma. Endocrinology 73, 353 (1963).
236. - K.G.SCHMIDT, W.J.STAUBITZ: Increased unbound cortisol in the plasma of estrogen-treated subjects. J. clin. Invest. 43, 1066 (1964).
237. POLLER, L., J.M.THOMSON: Clotting factors during oral contraception: Further report. Brit. med. J. 2, 23 (1966).
238. - A.TABIOWO, C.M.PRIEST: Progesterone oral contraception and blood coagulation. Brit. med. J. 1, 554 (1969).
239. PORATH, I., P.FLODIN: Gel filtration: A method for desalting and group separation. Nature (Lond.) 183, 1657 (1959).
240. QUINCEY, R.V., C.H.GRAY: A comparison of protein binding of cortisol as measured by equilibrium dialysis and gel filtration. J. Endocr. 26, 509 (1963).
241. REED, D.L., W.W.COON: Thromboembolism in patients receiving progestational drugs. New Engl. J. Med. 269, 622 (1963).
242. ROBERTSON, M.E., M.STIEFEL, J.C.LAIDLAW: The influence of estrogen on the secretion, disposition, and biological activity of cortisol. J. clin. Endocr. 19, 1381 (1959).

243. ROBINSON, R.W.: Effect of estrogen-progestin combinations on clotting factors. *Amer. J. Obstet. Gynec.* 99, 163 (1967).
244. ROCK, J., G.PINCUS, C.R.GARCIA: Effects of certain 19-nor-steroids on the normal human menstrual cycle. *Science* 124, 891 (1956).
245. ROOKS, W.H., M.H.HANKS: The relative expressed estrogenicity of the newer low-dose oral contraceptives. *Fertil. and Steril.* 22, 251 (1971).
246. - S.L.KUGLER, R.I.DORFMAN: The relative expressed estrogenicity of oral contraceptives. *Fertil. and Steril.* 19, 419 (1968).
247. ROSENBERG, M.: The link between norethynodrel and thromboembolism. *Amer. J. Obstet. Gynec.* 90, 745 (1964).
248. ROSENTHAL, H.E., W.R.SLAUNWHITE Jr., A.A.SANDBERG: Transcortin: A corticosteroid-binding protein of plasma. X. Cortisol and progesterone interplay and unbound levels of these steroids in pregnancy. *J. clin. Endocr.* 29, 352 (1969).
249. RUBIN, B.L., A.S.DORFMAN, L.BLACK, R.I.DORFMAN: Bioassay of estrogens using the mouse uterine response. *Endocrinology* 49, 429 (1951).
250. RUDEL, H.W., J.MARTINEZ-MANAU TOU, M.MAQUEO-TOPE TE: The role of progestogens in hormonal control of fertility. *Fertil. and Steril.* 16, 158 (1965).
251. SACHS, L.: *Statistische Methoden - Ein Soforthelfer.* Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1970.
252. - *Statistische Auswertungsmethoden.* Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1972.
253. SANDBERG, A.A., H.ROSENTHAL, S.L.SCHNEIDER, W.R.SLAUNWHITE Jr.: Protein-steroid interactions and their role in the transport and metabolism of steroids. In: *Steroid dynamics*, p.1. Academic Press, London-New York 1966.
254. - - W.R.SLAUNWHITE Jr.: Transcortin: A corticosteroid-binding protein of plasma. VIII. Parameters affecting cortisol metabolism. *Proc. Sec. Intern. Congr. on Hormonal Steroids. Excerpta med. Intern. Congr. Ser.* 132 (Amst.), p.707 (1967).
255. - - - Interaction of cortisol and progesterone with transcortin, albumin and unspecified proteins in pregnancy. *Excerpta med. Intern. Congr. Ser.* 157 (Amst.) (3.Intern. Congr. Endocr.), p.161 (1968).
256. - - - Certain metabolic effects of estrogens. In: *Metabolic effects of gonadal hormones and contraceptive steroids*, p.367. Plenum Press, London-New York 1969.

257. - W.R.SLAUNWHITE Jr.: Transcortin: A corticosteroid-binding plasma protein. J. clin. Invest. 37, 928 (1958).
258. - Transcortin: A corticosteroid-binding protein of plasma. II. Levels in various conditions and the effects of estrogens. J. clin. Invest. 38, 1290 (1959).
259. - - Transcortin: A corticosteroid-binding protein of plasma. V. In vitro inhibition of cortisol metabolism. J. clin. Invest. 42, 51 (1963).
260. - - H.N.ANTONIADES: The binding of steroids and steroid conjugates to human plasma proteins. Recent Progr. Hormone Res. 13, 209 (1957).
261. - - A.C.CARTER: Transcortin: A corticosteroid-binding protein of plasma. III. The effects of various steroids. J. clin. Invest. 39, 1914 (1960).
262. - M.WOODRUFF, H.ROSENTHAL, S.NIENHOUSE, W.R.SLAUNWHITE Jr.: Transcortin: A corticosteroid-binding protein of plasma. VII. Half-life in normal and estrogen-treated subjects. J. clin. Invest. 43, 461 (1964).
263. SARTWELL, P.E., A.T.MASI, F.G.ARTHES, G.R.GREENE, H.E. SMITH: Thromboembolism and oral contraceptives: An epidemiologic case control-study. Amer. J. Epidemiol. 90, 365 (1969).
264. SAUNDERS, F.J., V.A.DRILL: Some biological activities of 17-ethynyl and 17-alkyl derivatives of 17-OH-estrenones. Ann. N.Y. Acad. Sci. 71, 516 (1958).
265. - R.A.EDGREN, V.A.DRILL: On the progestational activity of 17 α -ethynyl-17-OH-5(10)-estren-3-one (norethynodrel). Endocrinology 60, 804 (1957).
266. - E.F.NUTTING, S.E.MARES: Comparison of biological activities of mestranol and ethinyl estradiol. Terapia antibiotica e chemioterapia 20, 71 (1970). Zit. bei V.A.DRILL & D.W.CALHOUN (1972 b).
267. SEAL, U.S., R.P.DOE: Purification and properties of "transcortin", the corticosteroid-binding globulin. Fed. Proc. 20, 179 (1961).
268. - - Corticosteroid-binding globulin. I. Isolation from plasma of diethylstilbestrol-treated men. J. biol. Chem. 237, 3136 (1962 a).
269. - - Purification and properties of transcortin, the cortisol-binding globulin from patients with cancer of the prostate. Cancer chemother. Rept. 16, 329 (1962 b).
270. - - Corticosteroid-binding globulin: Species distribution and small-scale purification. Endocrinology 73, 371 (1963).

271. - - Corticosteroid-binding globulin: Biochemistry, physiology, and phylogeny. In: Steroid dynamics, p.63. Academic Press, London-New York 1966.
272. - - The role of corticosteroid-binding globulin in mammalian pregnancy. Proc. Sec. Intern. Congr. on Hormonal Steroids. Excerpta med. Intern. Congr. Ser. 132 (Amst.), p.697 (1967).
273. - - Nonprotein-bound (NPC) and corticosteroid-binding globulin (CBG) in mammalian pregnancy. Excerpta med. Intern. Congr. Ser. 157 (Amst.) (3.Intern. Congr. Endocr.), p.161 (1968).
274. - - Effects of gonadal contraceptive hormones on protein and amino acid metabolism. In: Metabolic effects of gonadal hormones and contraceptive steroids, p.227. Plenum Press, London-New York 1969.
275. SEARLE & Co. Ltd., High Wycombe, England: persönliche Mitteilung (1971).
276. SEIGEL, D.G., R.E. MARKUSH: Oral contraceptives and relative risk of death from venous and pulmonary thromboembolism in the U.S. Amer. J. Epidem. 90, 11 (1969).
277. SETTLAGE, D.F., R.M. NAKAMURA, V. DAVAJAN, K. KHARMA, D.R. MISHELL: A quantitative analysis of serum proteins during treatment with oral contraceptive steroids. Contraception 1, 101 (1970).
278. SHORR, E.: An evaluation of the clinical applications of the vaginal smear method. J. Mt. Sinai Hosp. 12, 667 (1945). Zit. bei A.A. SANDBERG et al. (1960).
279. SLAUNWHITE, W.R., Jr., G.N. LOCKIE, N. BACK, A.A. SANDBERG: Inactivity in vivo of transcortin-bound cortisol. Science 135, 1062 (1962).
280. - A.A. SANDBERG: Transcortin: A corticosteroid-binding protein of plasma. J. clin. Invest. 38, 384 (1959).
281. - - Analysis of corticosteroids. Acta endocr. (Kbh.) Suppl. 147, 144 (1970).
282. - S. SCHNEIDER, F.C. WISSLER, A.A. SANDBERG: Transcortin: A corticosteroid-binding protein of plasma. IX. Isolation and characterization. Biochemistry 5, 3527 (1966).
283. SNART, R.S.: Method for determination of binding capacity and endogenous concentrations of steroids. Biochem. J. 111, 254 (1969).
284. SONG, C.S., I.R. MERKATZ, A.B. RIFKIND, P.N. GILLETTE, A. KAPPAS: The influence of pregnancy and oral contraceptive steroids on the concentration of plasma proteins. Amer. J. Obstet. Gynec. 108, 227 (1970).

285. SØRENSEN, S.P.L.: Biochem. Z. 22, 352 (1909) und Ergebn. Physiol. 12, 393 (1912). Ohne Titelangabe zit. in: Documenta Geigy - Wissenschaftliche Tabellen, S.277. Geigy, Basel 1960.
286. STEINBECK, H.: unveröffentlichte Ergebnisse. Zit. bei J.UFER (1972).
287. STERBA, R.: Östrogenspiegel der oralen Kontrazeptionsmittel. IPPF Med. Bull. 4 (6), 1 (1970).
288. STOKES, T., V.WYNN: Serum lipids in women on oral contraceptives. Lancet 2, 677 (1971).
289. STRAUSS, J.S., A.M.KLIGMAN: Androgenic effects of a progestational compound, 17 α -ethynyl-19-nortestosterone (Norlutin), on the human sebaceous gland. J. clin. Endocr. 21, 215 (1961 a).
290. - - The effect of progesterone and progesterone-like compounds on the human sebaceous gland. J. invest. Derm. 36, 309 (1961 b).
291. - - P.E.POCHI: The effect of androgens and estrogens on human sebaceous glands. J. invest. Derm. 39, 139 (1962).
292. - P.E.POCHI: The human sebaceous gland: Its regulation by steroidal hormones and its use as an end organ for assaying androgenicity in vivo. Recent Progr. Hormone Res. 10, 385 (1963 a).
293. - - Effect of Enovid on sebum production in females. Arch. Derm. 87, 366 (1963 b).
294. - - Effect of cyclic progestin-estrogen therapy on sebum and acne in women. J. Amer. med. Ass. 190, 815 (1964).
295. SUCHOWSKY, G.K., G.BALDRATTI: Relationship between progestational activity and chemical structure of synthetic steroids. J. Endocr. 30, 159 (1964).
296. - - G.ARCARI, E.SCRASCIA: Die Beeinflussung von zentralen Regulationsmechanismen durch Steroide. Arzneimittel-Forsch. 15, 437 (1965).
297. TAIT, J.F., S.BURSTEIN: In vivo studies of steroid dynamics in man. In: The hormones, vol. V, p.441. Academic Press, New York-London 1964.
298. TAUSK, M.: Natuurlijke en synthetische hormoonpreparaten. Ned. T. Geneesk. 111, 1286 (1967).
299. TENHAEFF, D.: Gezielter Einsatz von Ovulationshemmern. Ärztl. Prax. 23, 3351 (1971).

300. TETER, J.; R. STUPNICKI: A comparative study of the estrogenic potential of two synthetic estrogens (mestranol and ethinylestradiol). *Acta cytol.* (Baltimore) 15, 167 (1971).
301. THORNEYCROFT, I. H., S. STONE, K. KHARMA, Y. NAGATA, R. M. NAKAMURA, D. R. MISHELL: Effect of oral contraceptive steroids upon endogenous ovarian steroid production. *Excerpta med. Intern. Congr. Ser.* 234 (Amst.) (VII. World Congr. Fertil. Steril.), p. 78 (1971).
302. TRAPP, G. A., C. D. WEST: Determination of corticosteroid-binding proteins by an adsorption method. *J. Lab. clin. Med.* 73, 861 (1969).
303. TURNER, V. H., C. D. DAVIS, E. C. HAMBLIN: Oral therapy with sodium estrone sulfate. I. Induction of bleeding and cycle regulation in functional amenorrhea. *J. clin. Endocr.* 3, 453 (1943).
304. UFER, J.: persönliche Mitteilung (1972).
305. UPTON, G. V., P. K. BONDY: The binding of cortisol by plasma protein. *Arch. Biochem.* 78, 197 (1958).
306. U.S. DEPT. OF HEALTH, EDUCATION AND WELFARE, FOOD AND DRUG ADMINISTRATION: Second report on oral contraceptives. Advisory Committee on Obstetrics and Gynecology. August 1, 1969. *Zit. bei J. BARBOSA et al.* (1971).
307. - Oral contraceptives and thromboembolic disorders. FDA Current Drug Inform. April 24, 1970. *Zit. bei H. LUDWIG* (1970).
308. VESSEY, M. P., R. DOLL: Investigation of relation between use of oral contraceptives and thromboembolic disease. *Brit. med. J.* 2, 199 (1968).
309. WARREN, J. C., H. A. SALHANICK: Measurement of cortisol-binding capacity in human plasma. *Proc. Soc. exp. Biol.* 105, 624 (1960).
310. WESTPHAL, U.: Binding of steroids to proteins. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 41, 481 (1964). *Zit. bei U. WESTPHAL* (1971).
311. - Steroid-protein interactions. XII. Distribution of progesterone and corticosteroid hormones among serum proteins. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 346, 243 (1966).
312. - Steroid-protein interactions. XIII. Concentrations and binding affinities of corticosteroid-binding globulins in sera of man, monkey, rat, rabbit, and guinea pig. *Arch. Biochem.* 118, 556 (1967 a).

- 313. - Assay and properties of corticosteroid-binding globulin and other steroid-binding serum proteins. In: Methods in enzymology, vol. XV, p.761. Academic Press, New York-London 1969.
- 314. - Steroid-protein interactions. In: Monographs on endocrinology, vol. 4. Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1971.
- 315. - G.J.CHADER, G.B.HARDING: Decomposition of cortisol-4-14C to 11 β -hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione-4-14C. Steroids 10, 155 (1967 b).
- 316. - H.E.FIRSCHEIN, E.M.PEARCE: Binding of hydrocortisone-4-C14 and progesterone-4-C14 to serum albumin, demonstrated by paper electrophoresis. Science 121, 601 (1955).
- 317. YATES, F.E., J.URQUHART: Control of plasma concentrations of adrenocortical hormones. Physiol. Rev. 42, 359 (1962).
- 318. YEN, S.S.C.: Mestranol in ovulation suppression. Fertil. and Steril. 16, 97 (1965).

Herrn Prof.Dr.J.Hammerstein danke ich für die Überlassung des Themas, die kritische und anregende Diskussion von Ergebnissen wie die ständige Bereitschaft, meine Arbeit zu fördern.

Mein spezieller Dank gilt den technischen Assistentinnen im Hormonlabor der Abteilung für Gynäkologische Endokrinologie, insbesondere Frau B.Ott-Bauer und Frau B.Mannkopff für die zuverlässige Hilfe bei der Durchführung des klinisch-experimentellen Teils dieser Arbeit sowie Frau B.Fachinger und Frau K.Mantell für die Einarbeitung in methodisch-technische Fragen.

Der Firma Cilag-Chemie (Alsbach/Bergstraße) bin ich zu Dank verpflichtet für die finanzielle Unterstützung, die die Anstellung einer technischen Assistentin ermöglicht hat.

Herrn Prof.Dr.G.Fuchs gilt mein Dank für die Beratung bei der statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse.

Den Mitarbeitern der Graphik-Abteilung des Klinikum Steglitz danke ich für die Ausführung der Abbildungen.

Teilergebnisse dieser Arbeit sind mit Einverständnis von Herrn Prof.Dr.H.Coper (i.V. des ehemaligen Dekans) auf dem 8. Acta Endocrinologica Kongress in Kopenhagen (1971) und dem 39. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie in Wiesbaden (1972) vorgetragen worden.

LEBENS LAUF

Am 21. Juni 1944 wurde ich, Ulf Schwartz, als erstes von fünf Kindern des Professors Erwin Schwartz und seiner Ehefrau Ingrid Schwartz, geb. Maehle, in Posen geboren.

Meine Schulbildung umfaßt neben der Grundschulzeit (Knabenschule Oldenburg-Eversten, 1951-54) und einem einjährigen Austauschaufenthalt in den USA (Hastings/Michigan, 1960-61) den Besuch der Hindenburgschule Oldenburg, Old. (1954-63), an der ich am 14. Februar 1963 die Reifeprüfung mit Auszeichnung ablegte. Es folgte ein einsemestriges Studium der Amerikanistik und Politischen Wissenschaften in Berlin.

Das Medizinstudium absolvierte ich an der Freien Universität Berlin (1963-70). Während dieser Zeit war ich zusätzlich tätig als studentische Hilfskraft im Anatomischen Institut (1966-68) und als wissenschaftlicher Hilfsassistent in der Abteilung für Gynäkologische Endokrinologie der Universitätsfrauenklinik (1968-69). Die Ableistung der Famulaturzeit erfolgte u.a. in der Frauenklinik der Lovelace Clinic in Albuquerque/New Mexico, USA (1968). Die ärztliche Vorprüfung (17.2.1967) und die ärztliche Prüfung (25.8.1970) bestand ich jeweils mit dem Urteil "sehr gut".

Die Medizinalassistentenausbildung begann ich in der Abteilung für Gynäkologische Endokrinologie, Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin (Oktober 1970 - September 1971). Anschließend absolvierte ich die Pflichtzeiten in der Chirurgischen bzw. Medizinischen Klinik desselben Hauses (Oktober 1971 - Mai 1972). Die Approbation als Arzt wurde mir am 1. Juni 1972 erteilt.

Seit dem 18. Oktober 1972 arbeite ich als wissenschaftlicher Assistent in der Abteilung für Gynäkologische Endokrinologie der Frauenklinik und Poliklinik, Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin. Ab 1. Juni 1973 nehme ich ein einjähriges WHO Research Training Grant am Department of Obstetrics and Gynecology, Columbia University, New York/USA wahr.

